



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 C12N 15/54, 5/00, C12P 21/02, C12Q 1/48, C12N 9/12</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/29552</p> <p>(43) 国際公開日 1998年7月9日(09.07.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/04855</p> <p>(22) 国際出願日 1997年12月25日(25.12.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/357864 1996年12月27日(27.12.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 中外分子医学研究所 (CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.)[JP/JP] 〒300-41 茨城県新治郡新治村永井153番地2 Ibaraki, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 根津淳一(NEZU, Jun-ichi)[JP/JP] 奥 飛鳥(OKU, Asuka)[JP/JP] 〒300-41 茨城県新治郡新治村永井153番地2 株式会社 中外分子医学研究所内 Ibaraki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: NOVEL SERINE-THREONINE KINASE GENE</p> <p>(54)発明の名称 新規なセリン／スレオニンキナーゼ遺伝子</p> <p>(57) Abstract A novel gene having the consensus sequence of a serine-threonine kinase active site has been isolated according to the suppression subtractive hybridization method by preparing a library of genes expressed specifically for fetal livers and extracting clones from this library at random. This gene presumably participating in cell growth control, because it is highly expressed especially in actively growing cells and exhibits a significant homology with a vaccinia virus B1R kinase. Thus it is utilizable, for example, as a target for developing cell growth inhibitors or tumor inhibitors.</p>		

(57) 要約

本発明者らは、サプレッションサブトラクティブハイブリダイゼーション法により、胎児肝臓特異的に発現している遺伝子からなるライブラリーを作製し、このライブラリーよりランダムにクローンを抽出し、セリン/スレオニンキナーゼ活性部位のコンセンサス配列を含む新規な遺伝子を単離することに成功した。この遺伝子は、特に増殖性の高い細胞で強く発現し、また、ワクシニアウイルスのB1 Rキナーゼと有意な相同性を示したことから、細胞増殖の制御に関与していることが考えられる。従って、本発明の遺伝子は、例えば、細胞増殖阻害剤や腫瘍抑制剤の開発の標的として利用可能である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LV	ラトヴィア	ST	セント・ヘレナ
AT	オーストリア	GB	英国	MC	モナコ	TD	チャド
AZ	アゼルバイジャン	GG	ガブーン	MD	モルドバ	TM	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GM	ギニア	MG	マダガスカル	TT	トリニダード・トバゴ
BB	ババルグナ	GN	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア共和国	UA	ウクライナ
BF	ブルキナファソ	GR	ギリシャ	ML	マリ	UG	ウガンダ
BG	ブルガリア	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	US	米国
BJ	ベナン	DE	ドイツ	MR	モーリタニア	UY	ウルグアイ
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MW	モザンビーク	VN	ベトナム
BS	バハマ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	ZW	ジンバブエ
BT	ブータン	IS	アイスランド	NL	オランダ		
CA	カナダ	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド		
CC	ココス（キリング）諸島	JP	日本	NO	ノルウェー		
CD	コンゴ民主共和国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CF	中央アフリカ共和国	KR	韓国	PT	ポルトガル		
CG	コンゴ共和国	KK	カザフスタン	PR	プエルトリコ		
CH	スイス	KZ	カザフスタン	RU	ロシア		
CI	コートジボワール	LV	ラトヴィア	SE	スウェーデン		
CK	クック諸島	LL	リベリア	SK	スロバキア		
CL	チリ	LS	レソト	SL	シエラレオネ		
CM	カメルーン						
CO	コロンビア						
CR	コスタリカ						
CU	キューバ						
CY	キプロス						
CZ	チェコ						
DE	ドイツ						
EE	エストニア						

## 明細書

### 新規なセリン／スレオニンキナーゼ遺伝子

#### 技術分野

本発明は、新規なセリン／スレオニンキナーゼ遺伝子に関する。

#### 背景技術

胎児の組織には、活発に増殖を行っている未分化細胞、高度に活性化されている細胞、また新生血管内皮細胞等が多く含まれている。胎児の組織におけるこれらの細胞の活動は厳密な制御下にあり、個体の成熟に応じて抑制されていくが、制御を受けるかどうかという点を除けば、胎児の組織は固形腫瘍における状態に類似した状態にあるといえる。従って、胎児の組織に特異的、あるいはより強く発現している遺伝子(胎児遺伝子:fetal gene)の一部は、異常増殖性や、不死化、浸潤、転移、血管新生といった固形腫瘍に特徴的な現象に関与する遺伝子である可能性が存在する。また腫瘍以外の疾病についても、正常な生体では抑制されている胎児遺伝子が、異常に活性化されることにより起こるものと推測される。従って、胎児遺伝子を単離し、それらを解析することによって、腫瘍をはじめとする様々な疾病に関与する遺伝子を探索し得ると考えられる。

しかし、このような視点に立った、胎児遺伝子にのみ着目した組織的な解析については未だほとんど報告例がなく、これらの遺伝子群についての完全な理解には遠いというのが現状である。

#### 発明の開示

本発明は、胎児組織に特異的に発現している遺伝子を単離し、疾病に関連する遺伝子を探索することを課題とする。

本発明者らは、胎児組織の細胞の状態が固形腫瘍の細胞の状態の一つのモデルになり得ると考え、胎児遺伝子を単離し解析することによって、腫瘍など疾病に関与する遺伝子を探索し得ると考えた。さらに、その遺伝子を標的にした薬剤等を設計することにより、新たな作用機序による医薬品の開発が可能であると考え

た。そこで、本発明者らは、かかる考えに基づき、胎児遺伝子の単離を試みた。

具体的には、本発明者らは、サプレッション サブトラクティブ ハイブリダイゼーション法により、胎児肝臓特異的に（あるいは成人肝臓より強く）発現している遺伝子を多く含むサブトラクションライブラリーを作製し、このライブラリーよりランダムにクローンを抽出し、その構造の解析を行った。これにより、本発明者らは、セリン/スレオニンキナーゼ活性部位のコンセンサス配列を含む新規な遺伝子（VRK1）を単離することに成功した。また、本発明者らは、単離した遺伝子から推定されるアミノ酸配列を基にデータベース検索を行った。この結果、この遺伝子産物が、ワクシニアウイルスのDNA複製に関与していると考えられているB1Rキナーゼと有意な相同性を示すことを見出した。さらに、本発明者らは、この遺伝子と非常に高い相同性を持つヒトESTをデータベース上に見出し、その全長cDNA（VRK2）を単離した。ノーザンブロット解析により、種々の細胞における単離した2つの遺伝子の発現を解析したところ、これら遺伝子はヒト胎児肝臓、精巣や種々の癌細胞株など特に増殖性の高い細胞で強く発現していた。さらに、本発明者等は、VRK1タンパク質が実際にプロテインキナーゼ活性を有することを見いだした。

即ち、本発明は、新規なヒトセリン/スレオニンキナーゼ遺伝子「VRK1」および「VRK2」に関し、より具体的には、

- (1) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、またはその1もしくは数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換された配列を有しセリン/スレオニンキナーゼ活性を有するタンパク質、
- (2) 配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、またはその1もしくは数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換された配列を有しセリン/スレオニンキナーゼ活性を有するタンパク質、
- (3) 配列番号1に記載のDNA配列またはその相補配列にハイブリダイズするDNA配列によりコードされ、セリン/スレオニンキナーゼ活性を有するタンパク質、
- (4) 配列番号3に記載のDNA配列またはその相補配列にハイブリダイズするDNA配列によりコードされ、セリン/スレオニンキナーゼ活性を有するタンパク質

- (5) (1) 乃至 (4) のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA、
  - (6) (5) に記載のDNAを含むベクター、
  - (7) (6) に記載のベクターを保持する形質転換体、
  - (8) (7) に記載の形質転換体を培養する工程を含む、(1) 乃至 (4) のいずれかに記載のタンパク質の製造方法、
  - (9) (1) 乃至 (4) のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体、
  - (10) (5) に記載のDNAもしくはその一部に対するアンチセンスDNA、
  - (11) (1) 乃至 (4) のいずれかに記載のタンパク質のセリン／スレオニンキナーゼ活性を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、
    - (a) 被検化合物の存在下で、(1) 乃至 (4) のいずれかに記載のタンパク質とこれらタンパク質によりリン酸化を受ける基質とを接触させ、(1) 乃至 (4) のいずれかに記載のタンパク質のキナーゼ活性を検出する工程、
    - (b) 工程 (a) において検出されたキナーゼ活性を、被検化合物非存在下において検出したキナーゼ活性と比較し、(1) 乃至 (4) のいずれかに記載のタンパク質のキナーゼ活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、
- に関する。

本発明は、新規なセリン／スレオニンキナーゼ「VRK1」および「VRK2」に関する。「VRK1」のcDNAの塩基配列を配列番号：1に、タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。また「VRK2」のcDNAの塩基配列を配列番号：3に、タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：4に示す。「VRK1」cDNAは、ワクシニアウイルスのDNA複製に関与していることが示唆されるB1Rキナーゼと有意な相同性を有し、またその遺伝子は胎児肝臓、精巣、種々の癌細胞株など増殖性の高い細胞において強い発現を示すという特徴を有する。また、「VRK1」タンパク質の過剰発現はNIH3T3細胞の増殖活性を顕著に増大させる。これら事実、は、「VRK1」が、特に細胞増殖の制御機構に関与していることを示唆するものである。「VRK1」タンパク質はプロテインキナーゼ活性を有するため、この活性が細胞増殖の制御において重要な役割を担っていると考えられる。一方、「VRK2」は「VRK1」と高い相同性を有し、特にセリン／スレオニンキナーゼ領域において高い相同性を示す。「VRK2」

は「VRK1」と同様に、B1Rキナーゼと有意な相同性を有し、またその遺伝子は胎児肝臓、精巣、種々の癌細胞株など増殖性の高い細胞において強い発現を示すという特徴を有する。これら事実から「VRK2」も「VRK1」と同様の機能を担っていると考えられる。

「VRK1」タンパク質および「VRK2」タンパク質は、遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することができる。組換えタンパク質は、例えば、後述するようにこれらタンパク質をコードするDNAで形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。一方、天然のタンパク質は、当業者に周知の方法、例えば、後述の本発明の抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、これらタンパク質の発現の高い胎児肝臓や精巣、HeLa S3などの癌細胞株から単離することが可能である。抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体であれば、例えば、これらタンパク質をウサギなどの小動物に免疫し血清を得て、これを、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、これらタンパク質をカップリングしたアフィニティークラムなどにより精製することで調製することが可能である。また、モノクローナル抗体であれば、これらタンパク質をマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞にし、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、これらタンパク質に対する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、「VRK1」タンパク質または「VRK2」タンパク質をカップリングしたアフィニティークラムなどにより精製することで調製することが可能である。なお、得られた抗体を人体に投与する目的（抗体治療など）で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト型化抗体またはヒト抗体を用いると有効である。抗体をヒト型化する方法としては、モノクローナル抗体生産細胞から抗体遺伝子をクローニングし、その抗原決定部位を既存のヒト抗体に移植するCDRグラフト法など

が挙げられる。また、免疫系をヒトのものと入れ換えたマウスを免疫して、通常のモノクローナル抗体と同様に直接ヒト抗体を作製こともできる。

また、当業者であれば、天然型の「VRK1」タンパク質および「VRK2」タンパク質（配列番号：2および配列番号：4）のみならず、公知の方法を用いてこれらタンパク質中のアミノ酸の置換などを適宜行い、天然型のタンパク質と実質的に同一の機能を有するタンパク質を調製することが可能である。また、タンパク質のアミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このようにアミノ酸の置換、欠失、付加により天然型のタンパク質に対してアミノ酸配列が変異した変異体であって、セリン／スレオニンキナーゼ活性を有するタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。当業者に公知のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、PCRによる部位特異的変異誘発システム（GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland）、オリゴヌクレオチドによる部位特異的変異誘発法（Kramer, W. and Fritz, HJ (1987) *Methods in Enzymol.*, 154:350-367）、Kunkel法（*Methods Enzymol.* 85, 2763-2766 (1988)）などが挙げられる。なお、アミノ酸の置換は、通常、10アミノ酸以内であり、好ましくは6アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内である。置換、欠失、付加がなされる部位はセリン／スレオニンキナーゼ活性が保持される限り特に制限はない。アミノ酸の付加、欠失もしくは置換は、セリン／スレオニンキナーゼ活性部位のコンセンサス配列に相当する領域及びプロテインキナーゼATP結合部位のコンセンサス配列に相当する領域以外の領域であることがタンパク質の活性上好ましい。なお、タンパク質のセリン／スレオニンキナーゼ活性は、例えば、後述の実施例9に記載の方法により検出することが可能である。

また、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術（Sambrook, J et al., *Molecular Cloning* 2nd ed. 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989）などを用いて、「VRK1」タンパク質または「VRK2」タンパク質をコードするDNA（配列番号：1または3）またはその一部を基に、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAから「VRK1」タンパク質または「VRK2」タンパク質（配列番号：2または4）と実質的に同一の機能を有するタンパク質を得ることも通常行いうることである。このように「VRK1」タンパク質または「VRK2」タンパク質をコードするDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、セリン／スレオニンキナー

ぜ活性を有するタンパク質も本発明のタンパク質に含まれる。ハイブリダイズするDNAを他の生物から単離する場合には、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ウシなどが用いられ、特に胎児肝臓や精巣などの組織が単離に適している。これにより単離される「VRK1」タンパク質または「VRK2」タンパク質と実質的に同一の機能を有するタンパク質をコードするDNAは、通常、「VRK1」タンパク質または「VRK2」タンパク質をコードするDNA（配列番号：1または3）と高い相同性を有する。高い相同性とは、アミノ酸レベルにおいて少なくとも40%以上、好ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以上の配列の同一性を指す。特に、セリン／スレオニンキナーゼ活性部位のコンセンサス配列に相当する領域及びプロテインキナーゼATP結合部位のコンセンサス配列に相当する領域について高い相同性を有することが、タンパク質の活性上好ましい。

このようなDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件の例を示せば、以下の如くである。即ち、「ExpressHyb Hybridization Solution」（CLONTECH社製）を用い、55°Cで30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、37°Cから55°Cで1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、1xSSC、0.1% SDS中、37°Cで20分の洗浄を1回行う。より好ましい条件としては、「ExpressHyb Hybridization Solution」（CLONTECH社製）を用い、60°Cで30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、60°Cで1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、1xSSC、0.1% SDS中、50°Cで20分の洗浄を2回行う。さらに好ましい条件としては、「ExpressHyb Hybridization Solution」（CLONTECH社製）を用い、68°Cで30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、68°Cで1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、0.1xSSC、0.1% SDS中、50°Cで20分の洗浄を2回行う。

また、本発明は、上記本発明のタンパク質をコードするDNAに関する。本発明のDNAは、上記本発明のタンパク質をコードする限り、cDNAの他、ゲノムDNAや合成DNAなども含まれる。本発明のDNAは、組換えタンパク質の生産に利用する。



即ち、本発明のDNA（例えば、配列番号：1または3に記載のDNA）を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させたタンパク質を精製することにより組換えタンパク質を調製することが可能である。組換えタンパク質の生産に用いる細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞、NIH3T3細胞などの哺乳類細胞、Sf9細胞などの昆虫細胞、酵母細胞、大腸菌（E.coli）が挙げられる。また、細胞内で組換えタンパク質を発現させるためのベクターは、宿主細胞に応じて変動するが、例えば、哺乳類細胞のベクターとしてはpcDNA3（Invitrogen社製）やpEF-BOS（Nucleic Acids.Res.1990,18(17),p5322）などが、昆虫細胞のベクターとしては「BAC-to-BAC baculovirus expression system」（GIBCO BRL社製）などが、酵母細胞のベクターとしては「Pichia Expression Kit」（Invitrogen社製）などが、大腸菌のベクターとしてはpGEX-5X-1（Pharmacia社製）、「QIAexpress system」（Qiagen社製）などが挙げられる。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソームDOTAP（ベーリンガーマンハイム社製）を用いた方法、エレクトロポレーション法、塩化カルシウム法など用いて行うことができる。得られた形質転換体からの組換えタンパク質の精製は、常法、例えば、文献「The Qiaexpressionist handbook, Qiagen, Hilden, Germany」記載の方法を用いて行うことが可能である。

なお、本発明のDNAは、ゲノムDNAの変異に起因する疾患の遺伝子治療に用いることも考えられる。遺伝子治療に用いる場合には、本発明のDNAをアデノウイルスベクター（例えば、pAdexLcw）やレトロウイルスベクター（例えば、pZIPneo）などに挿入して、生体内に投与する。投与方法は、ex vivo法であっても、in vivo法であってもよい。

また、本発明のタンパク質は細胞増殖の制御に関与していると考えられるため、本発明のDNAもしくはその一部に対するアンチセンスDNAを、細胞増殖抑制剤や抗腫瘍薬として利用することも可能である。アンチセンスDNAは生体内に直接、または上記ベクターに挿入して投与する。アンチセンスDNAは当業者に公知の方法で合成することができる。

また、本発明は、本発明のタンパク質のセリン／スレオニンキナーゼ活性を阻

害する活性を有する化合物のスクリーニング方法に関する。このスクリーニング方法は、(a) 被検化合物の存在下で、本発明のタンパク質とこれらタンパク質によりリン酸化を受ける基質とを接触させ、本発明のタンパク質のキナーゼ活性を検出する工程、および(b) 工程(a)において検出されたキナーゼ活性を、被検化合物非存在下において検出したキナーゼ活性と比較し、本発明のタンパク質のキナーゼ活性を低下させる化合物を選択する工程を含む。

このスクリーニング方法に用いる被検化合物には特に制限はなく、低分子化合物、タンパク質(上記本発明の抗体も含む)、ペプチドなどが挙げられる。被検化合物は、人工的に合成したものであっても天然のものであってもよい。基質としては、例えば、カゼイン、I $\kappa$ B $\alpha$ タンパク質などが挙げられる。本発明のタンパク質のキナーゼ活性は、例えば、放射標識したリン酸を持つATPを、本発明のタンパク質および基質を含む反応系に添加し、基質に結合したリン酸の放射活性を測定する方法で検出することが可能である。具体的には、実施例9に記載の方法に従って検出することができる。これにより単離された化合物は、細胞増殖抑制剤や抗腫瘍薬としての利用が考えられる。また、本発明者らは「VRK1」タンパク質が、I $\kappa$ B $\alpha$ タンパク質をリン酸化することを見いだした。I $\kappa$ B $\alpha$ はリン酸化されると速やかな分解を受け、これにより結合しているNF- $\kappa$ Bを解放し、NF- $\kappa$ Bが活性化すると考えられている。そして、このNF- $\kappa$ Bは広範囲の免疫反応、炎症反応を引き起こす中心的な転写調節因子であることもよく知られている。このため本発明のタンパク質のキナーゼ活性を阻害する化合物は抗炎症剤や抗免疫剤としての利用も考えられる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、サブトラクションライブラリー作製に用いたアダプターを示す図である。

図2Aは、セリン/スレオニンキナーゼの活性部位のコンセンサス配列を示す図であり、図2Bは、プロテインキナーゼATP結合部位のコンセンサス配列を示す図である。

図3は、fls223クローンの塩基配列及びアミノ酸配列を示す図である。

図4は、胎児肝臓及び成人肝臓におけるVRK1、VRK2の発現を検出するためのRT-PCR解析の結果を示す電気泳動像である。図中、「A」は成人肝臓 (Adult liver) を示し、「F」は胎児肝臓 (Fetal liver) を示す。また、「低」、「中」、「高」は、PCRのサイクルのレベルを示す。

図5は、VRK1とB1Rのアミノ酸配列の比較を示す図である。

図6は、VRK1とVRK2のアミノ酸配列の比較を示す図である。

図7は、VRK2とB1Rのアミノ酸配列の比較を示す図である。

図8は、ノーザンブロッティングにより、種々の細胞におけるVRK1及びVRK2遺伝子の発現を解析した結果を示す電気泳動像である。

図9は、抗c-Myc抗体によるウエスタンブロッティング解析を示す電気泳動像である。1はpcDNA3プラスミドDNA、2はpcDNA3/VRK1mycプラスミドDNAをそれぞれトランスフェクションしたCOS7細胞の細胞抽出液を用いて検出した。

図10は、VRK1 cDNAをプローブとしたノーザン解析を示す電気泳動像である。1はpCOSプラスミドDNA、2はpCOS/VRK1wプラスミドDNAをそれぞれトランスフェクションしたNIH3T3細胞より調製した全RNA、3はヒト肝臓癌細胞株であるHepG2細胞より調製した全RNAを用いて検出した。

図11は、コロニーアッセイの結果を示す顕微鏡写真である。「pCOS」はpCOSプラスミドDNA、「pCOS/VRK1w」はpCOS/VRK1wプラスミドDNAをそれぞれNIH3T3細胞にトランスフェクションして得られた細胞プールを検出した。

図12は、精製されたGST融合タンパク質の電気泳動像 (CBB染色) を示す。1は野生型VRK1タンパク、2は変異型VRK1タンパクを用いて検出した。

図13は、キナーゼアッセイの結果を表す電気泳動像を示す。加えたタンパクを上部に「+」で示した。矢印は、「A」はリン酸化されたGST-VRK1 (自己リン酸化)、「C」はリン酸化されたカゼイン、「I」はリン酸化されたGST-IkBa、「P」はリン酸化されたIkBaのC末側ペプチドをそれぞれ示す。

図14は、キナーゼアッセイの結果を表す電気泳動像を示す。それぞれ右側に示した種類と濃度の二価カチオンの存在下で反応を行った。矢印は、「A」はリン酸化されたGST-VRK1 (自己リン酸化)、「C」はリン酸化されたカゼインをそれぞれ示す。

図15は、抗VRK1ペプチド抗体による、K562細胞抽出液を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す電気泳動像である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に制限されるものではない。

##### **[実施例1] サブトラクションライブラリーの作製**

サブトラクションライブラリーはPCR-Select™ cDNA Subtraction kit (CLONTech社製)を用い、ルダ・ディアチェンコ (Luda Diatchenko) らの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.93, 6025-6030, 1996.)に基本的に従って作製した。

まず、ヒト胎児肝臓由来polyA<sup>+</sup> RNA及びヒト成人肝臓由来polyA<sup>+</sup> RNAよりMLLV逆転写酵素を用いた標準的な方法で二本鎖cDNAを合成した。次にT4 DNAポリメラーゼによりこのcDNA末端を平滑化し、さらにRsaIにより切断した。胎児肝臓由来cDNA(テスター)の一部を2分割し、アダプター1とアダプター2(図1)をそれぞれ別々にライゲートした。これにそれぞれ過剰量の成人肝臓由来cDNA(ドライバー)を添加し、熱変性を行った後、68℃で8時間の1次ハイブリダイゼーションを行った。次にこれを熱変性せずに混合し、さらに熱変性した過剰量のドライバーを添加し68℃で約16時間の2次ハイブリダイゼーションを行った。これを希釈用バッファーにて希釈し、75℃で7分インキュベートし、アダプターの短い方の鎖を除去したものをPCRの鋳型として用いた。アダプターに対応するプライマーである「PCRプライマー1」(配列番号:5)、「PCRプライマー2」(配列番号:6)を用いたPCRを行うことにより、両端に異なるアダプターを持ったcDNA(サブトラクションされたcDNA)のみを選択的に増幅した(サプレッションPCR)。この一部を鋳型とし、「PCRプライマー1」(配列番号:5)、「PCRプライマー2」(配列番号:6)のさらに内側に位置するプライマーである「Nested PCRプライマー1」(配列番号:7)と「Nested PCRプライマー2」(配列番号:8)を用いたPCRを行うことにより、さらに選択性を増した生成物を得た。この生成物を「QIAquick PCR Purification kit」(QIAGEN社製)を用いて精製し、pT7Blue-Tベクター(Novagen社製)にTAクローニング法によりクローニングし、サブトラクションライブラリーとし

た。

### 〔実施例2〕 シークエンスの解読

シークエンシングは、アルカリSDS法によって調製したプラスミドDNA、またはコロニーPCR産物を鋳型とし、ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit With AmpliTaq DNA Polymerase,FSを用いたサイクルシークエンシング法により行い、ABI 377 DNA Sequencerにより解読した。

なお、コロニーPCRは、ベクタープライマーである「M13 P4-22プライマー」(配列番号：9)及び「M13 P5-22プライマー」(配列番号：10)を含むPCR反応溶液の中に、組み換え体を持つコロニーを直接懸濁することにより行った。PCR反応後、増幅されたインサートDNAから、ゲル濾過法などにより未反応のプライマー、ヌクレオチド等を除き、シークエンシングの鋳型として用いた。

この結果、fls223クローン(261bp)(後に「VRK1」と改名する)は、セリン/スレオニンキナーゼの活性部位のコンセンサス配列([Leu,Ile,Val,Met,Phe,Tyr,Cys]-Xaa-[His,Tyr]-Xaa-Asp-[Leu,Ile,Val,Met,Phe,Tyr]-Lys-Xaa-Xaa-Asn-[Leu,Ile,Val,Met,Phe,Tyr,Cys,Thr]-[Leu,Ile,Val,Met,Phe,Tyr,Cys,Thr]-[Leu,Ile,Val,Met,Phe,Tyr,Cys,Thr]) (配列番号：2に記載のアミノ酸の173~185番目に相当する)(図2A)を含むアミノ酸配列をコードし得ることが見いだされた(図3)。また、このクローンの塩基配列と完全一致する遺伝子はデータベースに登録されておらず、これは未知の遺伝子であった。

### 〔実施例3〕 RT-PCRアッセイ

胎児肝臓及び成人肝臓より抽出したpolyA<sup>+</sup> RNAから、SUPERSCRIPT™ II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase(GIBCO BRL社製)を用いた標準的な方法により1本鎖cDNAを合成し、その一部をfls223のRT-PCRアッセイの鋳型として用いた。PCRにはTaKaRa Taq(TaKaRa社製)をTaqポリメラーゼとして用い、これにTaqStart™ Antibody(CLONTECH社製)を加えることによるホットスタート法を行った。fls223増幅用のプライマーには、「FLS223 S1プライマー」(配列番号：11)及び「FLS223 A1プライマー」(配列番号：12)を用いた。

なお、対照として、様々な組織でほぼ均等に発現しているハウスキーピング遺伝子であり、様々な誘導物質によっても発現量に影響を受けにくいことが知られ

ているG3PDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 遺伝子を用いた。G3PDHは、「hG3PDH5'プライマー」(配列番号：13)及び「hG3PDH3'プライマー」(配列番号：14)を用いて増幅した。このRT-PCR解析により、fls223クローンは成人肝臓にもその発現が見られるものの、胎児肝臓により強く発現していることが確認された(図4)。そこで、次にこの遺伝子のより詳細な解析を目指し、全長cDNAのクローニングを行った。

[実施例4] RACE(Rapid Amplification of cDNA End)法によるクローニング  
Marathon<sup>TM</sup> Ready cDNA(CLONTECH社製)、あるいはMarathon<sup>TM</sup> cDNA Amplification Kit(CLONTECH社製)により作製したcDNAを鋳型とし、5' RACE及び3' RACE(Chenchik A. et al., CLONTECHniques X, 1, 5-8, 1995)を行った。

VRK1/fls223については、上記「FLS223 S1プライマー」(配列番号：11)及び「FLS223 A1プライマー」(配列番号：12)を5' RACE及び3' RACEのプライマーとして用いた。これらのプライマーと、鋳型cDNAのアダプターに対応するプライマーAP1(配列番号：15)との組み合わせで、基本的に94°Cで2分、「94°Cで30秒、68°Cで4分」を5サイクル、「94°Cで30秒、62°Cで1分、72°Cで3分」を30サイクル、72°Cで10分の反応を行った。PCRにはTaKaRa Ex Taq(TaKaRa社製)を用い、TaqStart<sup>TM</sup> Antibody(CLONTECH社製)を加えたホットスタート法を行った。反応後、現れたバンドをQIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて回収し、pT7Blue-Tベクター(Novagen社製)にサブクローニングした。

全塩基配列を解読した結果、fls223全長cDNAは396アミノ酸からなるオープンリーディングフレームをコードしていることが明らかとなった(配列番号：1参照)。このアミノ酸配列中には、前半にプロテインキナーゼATP結合部位のコンセンサス配列([Leu,Ile,Val]-Gly-Xaa-Gly-Xaa-[Phe,Tyr,Trp,Met,Gly,Ser,Thr,Asn,His]-[Ser,Gly,Ala]-Xaa-[Leu,Ile,Val,Cys,Ala,Thr]-Xaa-Xaa-[Gly,Ser,Thr,Ala,Cys,Leu,Ile,Val,Met,Phe,Tyr]-Xaa(5 times or 18 times)-[Leu,Ile,Val,Met,Phe,Tyr,Trp,Cys,Ser,Thr,Ala,Arg]-[Ala,Ile,Val,Pro]-[Leu,Ile,Val,Met,Phe,Ala,Gly,Cys,Lys,Arg]-Lys)(配列番号：2に記載のアミノ酸配列の43~71番目に相当する)(図2B)と、オリジナルクローンにも含まれていたセリン/スレオニンキナーゼ活性部位のコンセンサス配列が存在し、この遺伝子産物は新規の

セリン/スレオニンキナーゼであると考えられた。

また、全データベースに対してホモロジー検索を行ったところ、この遺伝子はワクシニアウイルスのB1R遺伝子産物(J. Gen. Virol., 70, 3187-3201, 1989; J. Gen. Virol., 72, 1349-1376, 1991)と高い相同性を示すことが判明した(図5)。B1R遺伝子は300アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、その配列中にプロテインキナーゼATP結合部位様配列、及びセリン/スレオニンキナーゼ活性部位のコンセンサス配列を含むことから、セリン/スレオニンキナーゼをコードしていると考えられている。fls223全長cDNAとB1R遺伝子は、キナーゼ部位のみならず、全体的に比較的高い相同性を示した(Blast searchにおけるSmallest Sum probability= 2.7e-78)。このことから、この遺伝子を「Vaccinia virus B1R kinase Related Kinase 1」(VRK1)と命名した。

B1Rキナーゼはワクシニアウイルスの感染後数時間といった初期に発現し、その後抑制される初期遺伝子である。この遺伝子中に点変異を持つ変異株はDNA複製の過程でウイルスの増殖が停止することが解明されており、この事実から、B1RキナーゼがウイルスDNAの複製機構を制御しているのではないかという仮説が提唱されている(J. Biol. Chem., 264, 21458-21461, 1989)。

VRK1は、セリン/スレオニンキナーゼ領域以外の部分においてもB1Rキナーゼと明らかな相同性を示している。従って、ウイルスにおける場合と同様に細胞のDNA複製の制御機構、あるいはより広い意味での細胞増殖の制御機構に参与していることが考えられる。このことは、VRK1が胎児肝臓や精巣などの増殖性の高い細胞が多い組織でより強く発現しているという事実からも裏付けられる。

さらにデータベース検索において、VRK1と非常に高いホモロジーを持つパブリックの「human EST - H80169」が存在することも明らかとなった。5' RACE及び3' RACEのプライマーとして、「RK A2プライマー」(配列番号: 16)及び「RK S1プライマー」(配列番号: 17)を用い、この遺伝子の全長cDNAのクローニングをVRK1と同様の方法で行ない全塩基配列を決定したところ、この遺伝子は508アミノ酸からなるオープンリーディングフレームをコードしており(配列番号: 3参照)、そのアミノ酸配列中にセリン/スレオニンキナーゼ活性部位のコンセンサス配列が存在することが判明した。このことから、この遺伝子も新規セリン/スレ

オニンキナーゼをコードするものであると考えられた。このアミノ酸配列は、特にキナーゼ領域付近においてVRK1と非常に高い相同性を示し(図6)、またワクシニアウイルス B1Rキナーゼとも高い相同性を示した(図7)。これらの事実から、このキナーゼもB1Rキナーゼと密接な関係にあることが推測されたため、「Vaccinia virus B1R kinase Related Kinase 2」(VRK2)と命名した。

なお、VRK2においてもRT-PCR法において胎児肝臓に成人肝臓よりも強い発現があることが確かめられた(図4)。RT-PCRのプライマーには、「RK S2プライマー」(配列番号: 18)及び「RK A2プライマー」(配列番号: 16)を用いた。

#### [実施例5] クロモソームマッピング

GENEBRIDGE 4 Radiation Hybrid Panel (Research Genetics, Inc.)を用い、VRK1及びVRK2のクロモソームマッピング(Nature Genetics, 7, 22-28, 1994)を行った。このパネルのDNAを鋳型とし、VRK1の場合は上記の「FLS223 S1プライマー」(配列番号: 9)と「FLS223 A1プライマー」(配列番号: 12)の組み合わせにより、94°Cで5分、「94°Cで30秒、72°Cで2分」を5サイクル、「94°Cで30秒、68°Cで2分」を30サイクル、72°Cで3分の条件でPCRを行った。またVRK2については、「VRK2 Aプライマー」(配列番号: 19)と、「VRK2 Bプライマー」(配列番号: 20)の組み合わせにより、94°Cで3分、「94°Cで30秒、60°Cで1分、72°Cで2分」を30サイクル、72°Cで5分の条件でPCRを行った。得られたパターンをインターネット上のデータベース(<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>)において解析し、マップを得た。

この結果、VRK1は第14番染色体のSTSマーカー「D14S265」と「AFM063XE7」に挟まれた位置に、またVRK2は、第2番染色体のSTSマーカー「CHLC.GATA23H01」と「D2S357」に挟まれた位置にマッピングされた。

#### [実施例6] ノーザン解析

様々なヒト正常組織と癌細胞株におけるVRK1及びVRK2 mRNAの発現を、ノーザンブロット法により解析した(図8)。

VRK1 cDNAの5'側断片(546番目のHindIIIサイトより上流部分)及びVRK2 cDNAの5'側断片(426番目のEcoRIサイトより上流部分)を、Ready-to Go DNA labelling beads (Pharmacia社製)を用いたランダムプライマー法により[ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTPで



ラベルし、プローブとして用いた。Multiple Tissue Northern (MTN) Blot - Human, Human II, Human Fetal II, Human Cell line (CLONTECH社製)を用い、ExpressHyb Hybridization Solution (CLONTECH社製)中で、メーカー推奨の方法に従い、68°Cでハイブリダイゼーションを行った。最終的な洗浄は、0.1 X SSC, 0.1 % SDSにて50°Cで行い、ハイブリダイゼーションを行ったフィルター上のイメージを、BAS-2000IIバイオイメージングアナライザー(富士写真フイルム社製)によって解析した。

なお、図8中の「G361」は悪性黒色腫由来細胞であり、「A549」は肺癌由来細胞であり、「SW480」は結腸腺癌由来細胞であり、「Raji」はバーキットリンパ腫由来細胞であり、「MOLT-4」は急性リンパ芽球性白血病(T細胞)由来細胞であり、「K-562」は慢性骨髄性白血病由来細胞であり、「HeLaS3」は子宮頸部癌由来細胞であり、「HL60」は前骨髄性白血病由来細胞である。

この結果、VRK1の発現は胎児の組織において比較的高く、特に胎児肝臓に非常に強い発現がみられた。ほとんどの成人の組織に弱いVRK1の発現が見られたが、精巣、及び胸腺には特に強い発現が見られた。また癌細胞株では、調べた8種の細胞のうち6種の細胞において非常に強い発現が観察された。

また、VRK2の発現パターンも基本的にはVRK1の場合と同様であり、やはり胎児肝臓及び精巣に強い発現が見られた。癌細胞株にも同様に強い発現が見られたが、MOLT4には全く発現が見られない点で、VRK1の発現パターンと異なっていた。

#### [実施例7] 発現用プラスミドDNAの構築

VRK1およびVRK2の全コーディング領域を含むcDNAを、それぞれVRK1 S1プライマー(配列番号: 21)と、VRK1 A1プライマー(配列番号: 22)、およびVRK2 S1プライマー(配列番号: 23)と、VRK2 A1プライマー(配列番号: 24)を用いたPCRにより、ヒト胎児肝臓由来polyA<sup>+</sup>RNAより合成したcDNAから増幅した。この増幅産物を、プライマーの末端に付加したNotIサイトで切断し、アガロースゲル電気泳動によって正しいサイズを持つDNA断片を精製した。これを、あらかじめNotIで切断し、アルカリフォスファターゼ/CIAP(宝酒造社製)により末端を脱リン酸化したpCOSベクターに組み込んだ。このベクターはEF1 $\alpha$ プロモーターを持ち、広範な哺乳動物細胞株において、組み込んだcDNAを強く発現することができる。得られた

サブクローンをシーケンシングすることにより、PCRエラーなどの変異がないクローン(pCOS/VRK1w, pCOS/VRK2w)を選択し、以降の強制発現や、さらなる発現用プラスミドDNAの構築に用いた。

C末端に抗c-Myc抗体のエピトープ配列(配列番号：25)を付加した発現用プラスミドは、以下の様にして構築した。すなわち、pCOS/VRK1wおよびpCOS/VRK2wプラスミドDNA約50ngを鋳型とし、それぞれVRK1 MYC1プライマー(配列番号：26)とVRK1 MYC2プライマー(配列番号：27)、およびVRK2 MYC1プライマー(配列番号：28)とVRK2 MYC2プライマー(配列番号：29)を用いたPCRによってC末に抗c-Myc抗体のエピトープが付加されたコーディング配列を持つcDNAを増幅した。この際DNAポリメラーゼとして、KOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績社製)を用いた。この増幅産物を、プライマーの末端に付加したBamHIサイトで切断し、アガロースゲル電気泳動により正しいサイズを持つDNA断片を精製した。これを、あらかじめBamHIで切断し、アルカリフォスファターゼ/CIAP(宝酒造社製)により末端を脱リン酸化したpcDNA3ベクター(Invitrogen社製)に組み込んだ。得られたサブクローンをシーケンシングすることにより、PCRエラーなどの変異がないクローン(pcDNA3/VRK1myc, pcDNA3/VRK2myc)を選択し以降の実験に用いた。

大腸菌による、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)タンパク質との融合タンパク質としての発現用プラスミドDNAは以下のようにして構築した。すなわち、pCOS/VRK1wおよびpCOS/VRK2wプラスミドDNAを鋳型とし、それぞれVRK1 H3プライマー(配列番号：30)とVRK1 H4プライマー(配列番号：31)、およびVRK2 H3プライマー(配列番号：32)とVRK2 H4プライマー(配列番号：33)を用いたPCRによって、コーディング領域を増幅した。この増幅産物を、プライマーの末端に付加したBamHIサイトで切断し、アガロース電気泳動により正しいサイズを持つDNA断片を精製した。これを、あらかじめBamHIで切断し、アルカリフォスファターゼ/CIAP(宝酒造社製)により末端を脱リン酸化したpGEX-5X-1ベクター(Pharmacia社製)に組み込んだ。得られたサブクローンをシーケンシングすることにより、PCRエラーなどの変異がないクローン(pGEX/VRK1w, pGEX/VRK2w)を選択し以降の実験に用いた。

また、キナーゼ触媒部位における推定ATP結合サイトへ変異を導入したクローン

(配列番号：2のアミノ酸配列の71番目のLysをTrpに置換)の作製は、Chameleon™ Double-Stranded Site-Directed Mutagenesis Kit(STRATAGENE社製)を用い、以下の様に行った。すなわち、pGEX/VRK1wプラスミドDNA約1 $\mu$ gと、VRK1 KW1プライマー(配列番号：34)、および選択用プライマーであるSelect1プライマー(配列番号：35)を混合し、これを5分間煮沸することによって熱変性した。これを、室温で30分保温することにより変異を含む両プライマーとプラスミドDNAとをアニーリングさせた。次に、基質塩基とDNAポリメラーゼ等を加えることにより、このプライマーから新しいDNA鎖を合成した。これをPstIで切断することにより野生型のプラスミドDNAを切断し、XLmutSコンピテント細胞に導入した。一晩液体培養した後プラスミドDNAを抽出し、さらに混在する野生型プラスミドDNAをPstIにより切断した後、再びコンピテント細胞に導入した。シングルコロニーをいくつか単離し、それぞれをシーケンシングすることにより、変異が導入されたクローン(pGEX/VRK1K71W)を選択した。

【実施例8】 哺乳類細胞株での発現

pcDNA3/VRK1mycプラスミドDNA、およびpcDNA3プラスミドDNAの約10 $\mu$ gを、SuperFect (Qiagen社製)を用いた方法により、COS7細胞に導入(トランスフェクション)した。すなわち、約10<sup>6</sup>個のCOS7細胞を10cmディッシュに蒔き、一晩培養した後、10 $\mu$ gのプラスミドDNAと60 $\mu$ lのSuperFectの混合物を添加し、約3時間培養を行った。その後培養液を新しいものに交換し、さらに2日間培養した後、細胞をトリプシン-EDTA液ではがして回収した。PBSで細胞を一度洗浄した後、RIPAバッファー(1% NP-40、10mM トリス-塩酸pH7.2、0.1%デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、0.15M 塩化ナトリウム、1mM EDTA、10 $\mu$ g/mlアプロチニン、1mM PMSF)中で細胞を破壊し、これを遠心する事によって細胞抽出液を得た。この細胞抽出液をSDSゲル電気泳動(SDS-PAGE)により分離し、抗c-Myc抗体(SANTA CRUZ社製)を用いてウエスタンブロッティングを行うと、pcDNA3/VRK1mycプラスミドDNAをトランスフェクションした場合に特異的に約50kDaのバンドが現れ、VRK1mycタンパク質が発現しているものと考えられた(図9)。

次に、pCOS/VRK1wプラスミドDNA、およびpCOSプラスミドDNAの約7.5 $\mu$ gを、カチオニックリン脂質DOTAP(ベーリンガーマンハイム社製)を用いた方法によりNIH

3T3細胞に導入した。トランスフェクション後、培養液に終濃度 $500\mu\text{g/ml}$ のG418 (GIBCO-BRL社製)を添加することにより、形質転換された細胞の選択を行った。こうして得られたそれぞれの形質転換細胞のプールより、全RNAをISOGEN(和光純薬社製)を用いた方法により調製し、VRK1 cDNAをプローブとしてノーザンブロットングを行った。その結果、pCOS/VRK1wプラスミドDNAをトランスフェクションして得られた細胞プールには、VRK1 mRNAが発現していることが確認された(図10)。これらの細胞プールを用い、軟寒天培地中におけるコロニー形成能を調べた(コロニーアッセイ)。すなわち、 $2 \times 10^4$ 個の細胞を、融解した0.4% SeaPlaqueアガロース(宝酒造社製)を含む10%ウシ胎児血清、DMEM(ダルベッコ変法イーグル培養液)中に懸濁し、これを0.53% SeaPlaqueアガロース、10%ウシ胎児血清、DMEMによって作製したボトムアガロースの上に重層した。2週間ほど培養を行った後観察すると、pCOS/VRK1wプラスミドDNAをトランスフェクションすることによって得られた細胞プールの場合、pCOSプラスミドDNAの場合に比較し、明らかにサイズの大きい細胞コロニーが多数形成されていた。このことから、VRK1を過剰発現することにより、細胞に異常な増殖活性が与えられることが示唆された(図11)。

#### [実施例9] 大腸菌におけるVRK1タンパク質の発現とキナーゼアッセイ

大腸菌により、GSTタンパク質との融合タンパク質として、野生型および変異型のVRK1タンパク質を発現させ、精製を行った。すなわち、上記pGEX/VRK1w、およびpGEX/VRK1K71WプラスミドDNAを保持している大腸菌DH5 $\alpha$ 株を、2xYT培地10ml中で37°C一晩培養した後、この一部を新たな2xYT培地で100倍に希釈し、600nmにおけるODが0.6になるまで37°Cで培養を続けた。その後IPTG(イソプロピル- $\beta$ -D(-)-チオガラクトピラノシド)を終濃度0.1mMになるように添加し、さらに培養を数時間続けた。大腸菌を遠心により集め、1% TritonX-100、1% Tween 20、PBSに懸濁し、超音波処理を施すことにより、細胞を破壊し、タンパク質を可溶化させた。この可溶化サンプルより、グルタチオンセファロース4B(Pharmacia社製)を用いたアフィニティー精製によって、GSTタンパク質との融合タンパク質として発現された野生型、および変異型のVRK1タンパク質を精製した。これらのタンパク質をSDS-PAGEにかけ、クーマシー(CBB)染色を行い、純度を確認した(図12)。また同様に、GSTタンパク質、およびGST-IkB $\alpha$ タンパク質もそれぞれ調製した。

キナーゼアッセイは、野生型または変異型VRK1タンパク質 0.2 $\mu$ g、50mM トリス塩酸(pH7.2)、1mM ジチオスレイトール(DTT)、2mM あるいは10mM 二価カチオン(Mg, Mn, Zn, Ca)、基質タンパク質  $\sim$ 5 $\mu$ g、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  3000Ci/mM, 10mCi/ml(アマシャム社製) 1 $\mu$ lで全量50 $\mu$ lとして行った。また、いくつかの実験においてはバッファー系として、40mM ヘベス pH7.4、1mM DTT、2.5mM EGTAを用いた。

具体的には、まず、基質タンパク質としてヒストン(ナカライ社製)、カゼイン(Sigma社製)、ミエリン塩基性タンパク質/MBP(Sigma社製)、GST、GST-I $\kappa$ B $\alpha$ 、並びにI $\kappa$ B $\alpha$ のC末側ペプチド(配列番号:36)を用い、10mM Mgの存在下で37°C、30分間の反応を行った。反応液をSDS-PAGEにかけ、リン酸化されたタンパク質の放射活性をBAS2000IIバイオイメーキングアナライザー(富士写真フイルム社製)によって解析した。その結果、野生型VRK1タンパク質は、カゼインおよびGST-I $\kappa$ B $\alpha$ をリン酸化する事が示された(図13)。一方、推定ATP結合部位に変異を導入した変異VRK1を用いた場合にはリン酸化は観察されず、このことからVRK1が一般的な触媒部位を持つプロテインキナーゼであることが示された。また、VRK1によってGSTタンパク質は全くリン酸化されないことから、GST-I $\kappa$ B $\alpha$ タンパク質におけるリン酸化は、GST部位ではなく、I $\kappa$ B $\alpha$ タンパク質内で起こっているものと考えられた。

I $\kappa$ B $\alpha$ は転写調節因子であるNF- $\kappa$ Bと複合体を形成することによりNF- $\kappa$ Bの機能を負に制御している因子であると考えられている。また、I $\kappa$ B $\alpha$ は自身がリン酸化されることにより速やかなタンパク質分解を受けて失活し、NF- $\kappa$ Bが解放されることにより活性化するという機構が広く受け入れられている。NF- $\kappa$ Bは広範囲の免疫反応、炎症反応を引き起こす中心的な転写調節因子であると考えられており、従ってI $\kappa$ B $\alpha$ をリン酸化するキナーゼは抗炎症薬の標的分子として重要である。VRK1はin vitroにおいてI $\kappa$ B $\alpha$ を強くリン酸化する活性を有することから、in vivoにおいてもI $\kappa$ B $\alpha$ をリン酸化することにより、NF- $\kappa$ Bの活性化に関与している可能性が考えられる。よって、VRK1のキナーゼ活性を阻害すること、あるいはタンパク質量を減少することなどにより、抗炎症効果、あるいは抗免疫効果が期待できるものと考えられた。

次に、VRK1リン酸化における二価カチオンの要求性を検討した(図14)。終濃

度2mM、あるいは10mMの各種二価カチオン(Mg, Mn, Zn, Ca)の存在下で、基質タンパク質としてカゼインを用いてキナーゼ反応を行った。その結果、Zn以外の二価カチオンにおいては、VRK1はリン酸化活性を持つことが示された。しかしその程度は異なっており、特にMn存在下に強い活性を示すことが明らかとなった。

#### [実施例10] VRK1タンパク質に対する抗体の作製

VRK1推定アミノ酸配列のC末端の配列に相当するペプチド（配列番号：37）を合成し（サワディテクノロジー）、*m*-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシニミドエステル(MBS)を介した方法により、そのアミノ末端のシステインでキーホールリンベットヘモシアニン(KLH)に結合させた。これを抗原としてウサギに免疫し、抗血清を得た。この抗血清より、ペプチドに特異的に反応する抗体を、ペプチドをセルロファイン（生化学工業社製）に結合して作製したアフィニティカラムを用いてアフィニティ精製した。VRK1を強く発現していることがノーザン解析により示されているK562細胞の細胞抽出液を用いてウエスタン解析を行ったところ、分子量約50kDaのシングルバンドが染色され、VRK1タンパク質を特異的に認識しているものと考えられた（図15）。

#### 産業上の利用可能性

本発明者らにより単離されたセリン／スレオニンキナーゼ遺伝子は、DNA複製に関与していることが示唆されているワクシニアウイルス遺伝子と有意な相同性を有し、また増殖性の高い細胞で強い発現を示す。さらに該遺伝子がコードするタンパク質の過剰発現は細胞の増殖活性を顕著に高める。このため単離したセリン／スレオニンキナーゼ遺伝子は、特に、細胞増殖の制御などに関与していると考えられる。従って、本発明の遺伝子を標的とした薬剤（アンチセンスDNAなど）やその発現を調節することが可能な薬剤、あるいは本発明の遺伝子によりコードされるタンパク質の活性を調節することが可能な薬剤をスクリーニングすることにより、新しい作用機序に基づく細胞増殖阻害剤や抗腫瘍薬の開発を行うことが可能であると考えられる。

配列表

- (1) 出願人氏名：株式会社中外分子医学研究所  
 (2) 発明の名称：新規なセリン／スレオニンキナーゼ遺伝子  
 (3) 整理番号：C 1－8 0 5 P C T  
 (4) 出願番号：  
 (5) 出願日：  
 (6) 優先権のもととなった出願をした国名および出願番号：日本国、特願平 8  
 － 3 5 7 8 6 4 号  
 (7) 優先日：平成 8 年 1 2 月 2 6 日  
 (8) 配列の数：3 7

配列番号： 1

配列の長さ： 1662

配列の型： 核酸

鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号： CDS

存在位置： 76..1266

配 列

CCGAGTTACG AGTCGGCGAA AGCGGCGGGA AGTTCGTACT GGGCAGAACG CGACGGGTCT	60
GCGGCTTAGG TGAAA ATG CCT CGT GTA AAA GCA GCT CAA GCT GGA AGA CAG	111
Met Pro Arg Val Lys Ala Ala Gln Ala Gly Arg Gln	
1 5 10	
AGC TCT GCA AAG AGA CAT CTT GCA GAA CAA TTT GCA GTT GGA GAG ATA	159
Ser Ser Ala Lys Arg His Leu Ala Glu Gln Phe Ala Val Gly Glu Ile	
15 20 25	
ATA ACT GAC ATG GCA AAA AAG GAA TGG AAA GTA GGA TTA CCC ATT GGC	207

Ile Thr Asp Met Ala Lys Lys Glu Trp Lys Val Gly Leu Pro Ile Gly  
 30 35 40  
 CAA GGA GGC TTT GGC TGT ATA TAT CTT GCT GAT ATG AAT TCT TCA GAG 255  
 Gln Gly Gly Phe Gly Cys Ile Tyr Leu Ala Asp Met Asn Ser Ser Glu  
 45 50 55 60  
 TCA GTT GGC AGT GAT GCA CCT TGT GTT GTA AAA GTG GAA CCC AGT GAC 303  
 Ser Val Gly Ser Asp Ala Pro Cys Val Val Lys Val Glu Pro Ser Asp  
 65 70 75  
 AAT GGA CCT CTT TTT ACT GAA TTA AAG TTC TAC CAA CGA GCT GCA AAA 351  
 Asn Gly Pro Leu Phe Thr Glu Leu Lys Phe Tyr Gln Arg Ala Ala Lys  
 80 85 90  
 CCA GAG CAA ATT CAG AAA TGG ATT CGT ACC CGT AAG CTG AAG TAC CTG 399  
 Pro Glu Gln Ile Gln Lys Trp Ile Arg Thr Arg Lys Leu Lys Tyr Leu  
 95 100 105  
 GGT GTT CCT AAG TAT TGG GGG TCT GGT CTA CAT GAC AAA AAT GGA AAA 447  
 Gly Val Pro Lys Tyr Trp Gly Ser Gly Leu His Asp Lys Asn Gly Lys  
 110 115 120  
 AGT TAC AGG TTT ATG ATA ATG GAT CGC TTT GGG AGT GAC CTT CAG AAA 495  
 Ser Tyr Arg Phe Met Ile Met Asp Arg Phe Gly Ser Asp Leu Gln Lys  
 125 130 135 140  
 ATA TAT GAA GCA AAT GCC AAA AGG TTT TCT CGG AAA ACT GTC TTG CAG 543  
 Ile Tyr Glu Ala Asn Ala Lys Arg Phe Ser Arg Lys Thr Val Leu Gln  
 145 150 155  
 CTA AGC TTA AGA ATT CTG GAT ATT CTG GAA TAT ATT CAC GAG CAT GAG 591  
 Leu Ser Leu Arg Ile Leu Asp Ile Leu Glu Tyr Ile His Glu His Glu  
 160 165 170  
 TAT GTG CAT GGA GAT ATC AAG GCC TCA AAT CTT CTT CTG AAC TAC AAG 639  
 Tyr Val His Gly Asp Ile Lys Ala Ser Asn Leu Leu Leu Asn Tyr Lys  
 175 180 185



AAT CCT GAC CAG GTG TAC TTG GTA GAT TAT GGC CTT GCT TAT CGG TAC	687
Asn Pro Asp Gln Val Tyr Leu Val Asp Tyr Gly Leu Ala Tyr Arg Tyr	
190 195 200	
TGC CCA GAA GGA GTT CAT AAA GAA TAC AAA GAA GAC CCC AAA AGA TGT	735
Cys Pro Glu Gly Val His Lys Glu Tyr Lys Glu Asp Pro Lys Arg Cys	
205 210 215 220	
CAC GAT GGC ACT ATT GAA TTC ACG AGC ATC GAT GCA CAC AAT GGT GTG	783
His Asp Gly Thr Ile Glu Phe Thr Ser Ile Asp Ala His Asn Gly Val	
225 230 235	
GCC CCA TCA AGA CGT GGT GAT TTG GAA ATA CTT GGT TAT TGC ATG ATC	831
Ala Pro Ser Arg Arg Gly Asp Leu Glu Ile Leu Gly Tyr Cys Met Ile	
240 245 250	
CAA TGG CTT ACT GGC CAT CTT CCT TGG GAG GAT AAT TTG AAA GAT CCT	879
Gln Trp Leu Thr Gly His Leu Pro Trp Glu Asp Asn Leu Lys Asp Pro	
255 260 265	
AAA TAT GTT AGA GAT TCC AAA ATT AGA TAC AGA GAA AAT ATT GCA AGT	927
Lys Tyr Val Arg Asp Ser Lys Ile Arg Tyr Arg Glu Asn Ile Ala Ser	
270 275 280	
TTG ATG GAC AAA TGT TTT CCT GAG AAA AAC AAA CCA GGT GAA ATT GCC	975
Leu Met Asp Lys Cys Phe Pro Glu Lys Asn Lys Pro Gly Glu Ile Ala	
285 290 295 300	
AAA TAC ATG GAA ACA GTG AAA TTA CTA GAC TAC ACT GAA AAA CCT CTT	1023
Lys Tyr Met Glu Thr Val Lys Leu Leu Asp Tyr Thr Glu Lys Pro Leu	
305 310 315	
TAT GAA AAT TTA CGT GAC ATT CTT TTG CAA GGA CTA AAA GCT ATA GGA	1071
Tyr Glu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Leu Gln Gly Leu Lys Ala Ile Gly	
320 325 330	
AGT AAG GAT GAT GGC AAA TTG GAC CTC AGT GTT GTG GAG AAT GGA GGT	1119
Ser Lys Asp Asp Gly Lys Leu Asp Leu Ser Val Val Glu Asn Gly Gly	

335	340	345	
TTG AAA GCA AAA ACA ATA ACA AAG AAG CGA AAG AAA GAA ATT GAA GAA			1167
Leu Lys Ala Lys Thr Ile Thr Lys Lys Arg Lys Lys Glu Ile Glu Glu			
350	355	360	
AGC AAG GAA CCT GGT GTT GAA GAT ACG GAA TGG TCA AAC ACA CAG ACA			1215
Ser Lys Glu Pro Gly Val Glu Asp Thr Glu Trp Ser Asn Thr Gln Thr			
365	370	375	380
GAG GAG GCC ATA CAG ACC CGT TCA AGA ACC AGA AAG AGA GTC CAG AAG			1263
Glu Glu Ala Ile Gln Thr Arg Ser Arg Thr Arg Lys Arg Val Gln Lys			
385	390	395	
TAATTCAGAT GCTGTGAACC AGATTTCCTT TTCTTTGTTT TCTTTTGA CT TTTTCTCCT			1323
TTTCTGTTAG AACTGTTTTA TTTTCCTGTG AGTCTTGCGA GGTGGAATTA ATGATTAAAT			1383
ACTCATGTGT TCAGAAAACA TAACTTTTTT TTATAAAAAT ATTTTGTACA ATTCATTAAA			1443
GGCTAATTTA TGAAATTTGA AAATCTTCAG GTTATACTCC TTAAGTTATC CCAAAGCCGT			1503
GTGTTTGTGA TGTTTTGGAG TACATATATA TGAAAATTAT TATGACACGC ACTTTTCTAA			1563
TCATTGTACA TTTCTCAGAG TGGATAAAAA TGTTTGACAA AGTCCTCACT TTTAAGGAAA			1623
TGCAAAGCTT AAAATAAAAC TCTCTTTTGT TTGATGCAG			1662

配列番号 : 2

配列の長さ : 396

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配 列

	Met	Pro	Arg	Val	Lys	Ala	Ala	Gln	Ala	Gly	Arg	Gln
	1				5					10		
Ser	Ser	Ala	Lys	Arg	His	Leu	Ala	Glu	Gln	Phe	Ala	Val
	15					20				25		
Ile	Thr	Asp	Met	Ala	Lys	Lys	Glu	Trp	Lys	Val	Gly	Leu
												Gly

30	35	40	
Gln Gly Gly Phe Gly Cys Ile Tyr Leu Ala Asp Met Asn Ser Ser Glu			
45	50	55	60
Ser Val Gly Ser Asp Ala Pro Cys Val Val Lys Val Glu Pro Ser Asp			
	65	70	75
Asn Gly Pro Leu Phe Thr Glu Leu Lys Phe Tyr Gln Arg Ala Ala Lys			
	80	85	90
Pro Glu Gln Ile Gln Lys Trp Ile Arg Thr Arg Lys Leu Lys Tyr Leu			
	95	100	105
Gly Val Pro Lys Tyr Trp Gly Ser Gly Leu His Asp Lys Asn Gly Lys			
	110	115	120
Ser Tyr Arg Phe Met Ile Met Asp Arg Phe Gly Ser Asp Leu Gln Lys			
125	130	135	140
Ile Tyr Glu Ala Asn Ala Lys Arg Phe Ser Arg Lys Thr Val Leu Gln			
	145	150	155
Leu Ser Leu Arg Ile Leu Asp Ile Leu Glu Tyr Ile His Glu His Glu			
	160	165	170
Tyr Val His Gly Asp Ile Lys Ala Ser Asn Leu Leu Leu Asn Tyr Lys			
	175	180	185
Asn Pro Asp Gln Val Tyr Leu Val Asp Tyr Gly Leu Ala Tyr Arg Tyr			
	190	195	200
Cys Pro Glu Gly Val His Lys Glu Tyr Lys Glu Asp Pro Lys Arg Cys			
205	210	215	220
His Asp Gly Thr Ile Glu Phe Thr Ser Ile Asp Ala His Asn Gly Val			
	225	230	235
Ala Pro Ser Arg Arg Gly Asp Leu Glu Ile Leu Gly Tyr Cys Met Ile			
	240	245	250
Gln Trp Leu Thr Gly His Leu Pro Trp Glu Asp Asn Leu Lys Asp Pro			
	255	260	265

Lys Tyr Val Arg Asp Ser Lys Ile Arg Tyr Arg Glu Asn Ile Ala Ser  
 270 275 280  
 Leu Met Asp Lys Cys Phe Pro Glu Lys Asn Lys Pro Gly Glu Ile Ala  
 285 290 295 300  
 Lys Tyr Met Glu Thr Val Lys Leu Leu Asp Tyr Thr Glu Lys Pro Leu  
 305 310 315  
 Tyr Glu Asn Leu Arg Asp Ile Leu Leu Gln Gly Leu Lys Ala Ile Gly  
 320 325 330  
 Ser Lys Asp Asp Gly Lys Leu Asp Leu Ser Val Val Glu Asn Gly Gly  
 335 340 345  
 Leu Lys Ala Lys Thr Ile Thr Lys Lys Arg Lys Lys Glu Ile Glu Glu  
 350 355 360  
 Ser Lys Glu Pro Gly Val Glu Asp Thr Glu Trp Ser Asn Thr Gln Thr  
 365 370 375 380  
 Glu Glu Ala Ile Gln Thr Arg Ser Arg Thr Arg Lys Arg Val Gln Lys  
 385 390 395

配列番号 : 3

配列の長さ : 1833

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 131..1657

配 列

CTGCACTGCG AGGCCGACGC AGCTGGAGAG AAGTTAGGCA GGTCCCTAGGG AGGGCAGGCT 60  
 CGAGTGCTGG GCCCGCCTCC CCGCGGGACT GTAGGCCCGG GGGCTCCGCC TCGTCGACG 120

GGCAGAAGTG ATG CCA CCA AAA AGA AAT GAA AAA TAC AAA CTT CCT ATT	169
Met Pro Pro Lys Arg Asn Glu Lys Tyr Lys Leu Pro Ile	
1 5 10	
CCA TTT CCA GAA GGC AAG GTT CTG GAT GAT ATG GAA GGC AAT CAG TGG	217
Pro Phe Pro Glu Gly Lys Val Leu Asp Asp Met Glu Gly Asn Gln Trp	
15 20 25	
GTA CTG GGC AAG AAG ATT GGC TCT GGA GGA TTT GGA TTG ATA TAT TTA	265
Val Leu Gly Lys Lys Ile Gly Ser Gly Gly Phe Gly Leu Ile Tyr Leu	
30 35 40 45	
GCT TTC CCC ACA AAT AAA CCA GAG AAA GAT GCA AGA CAT GTA GTA AAA	313
Ala Phe Pro Thr Asn Lys Pro Glu Lys Asp Ala Arg His Val Val Lys	
50 55 60	
GTG GAA TAT CAA GAA AAT GGC CCG TTA TTT TCA GAA CTT AAA TTT TAT	361
Val Glu Tyr Gln Glu Asn Gly Pro Leu Phe Ser Glu Leu Lys Phe Tyr	
65 70 75	
CAG AGA GTT GCA AAA AAA GAC TGT ATC AAA AAG TGG ATA GAA CGC AAA	409
Gln Arg Val Ala Lys Lys Asp Cys Ile Lys Lys Trp Ile Glu Arg Lys	
80 85 90	
CAA CTT GAT TAT TTA GGA ATT CCT CTG TTT TAT GGA TCT GGT CTG ACT	457
Gln Leu Asp Tyr Leu Gly Ile Pro Leu Phe Tyr Gly Ser Gly Leu Thr	
95 100 105	
GAA TTC AAG GGA AGA AGT TAC AGA TTT ATG GTA ATG GAA AGA CTA GGA	505
Glu Phe Lys Gly Arg Ser Tyr Arg Phe Met Val Met Glu Arg Leu Gly	
110 115 120 125	
ATA GAT TTA CAG AAG ATC TCA GGC CAG AAT GGT ACC TTT AAA AAG TCA	553
Ile Asp Leu Gln Lys Ile Ser Gly Gln Asn Gly Thr Phe Lys Lys Ser	
130 135 140	
ACT GTC CTG CAA TTA GGT ATC CGA ATG TTG GAT GTA CTG GAA TAT ATA	601
Thr Val Leu Gln Leu Gly Ile Arg Met Leu Asp Val Leu Glu Tyr Ile	

145	150	155	
CAT GAA AAT GAA TAT GTT CAT GGT GAT GTA AAA GCA GCA AAT CTA CTT			649
His Glu Asn Glu Tyr Val His Gly Asp Val Lys Ala Ala Asn Leu Leu			
160	165	170	
TTG GGT TAC AAA AAT CCA GAC CAG GTT TAT CTT GCA GAT TAT GGA CTT			697
Leu Gly Tyr Lys Asn Pro Asp Gln Val Tyr Leu Ala Asp Tyr Gly Leu			
175	180	185	
TCC TAC AGA TAT TGT CCC AAT GGG AAC CAC AAA CAG TAT CAG GAA AAT			745
Ser Tyr Arg Tyr Cys Pro Asn Gly Asn His Lys Gln Tyr Gln Glu Asn			
190	195	200	205
CCT AGA AAA GGC CAT AAT GGG ACA ATA GAG TTT ACC AGC TTG GAT GCC			793
Pro Arg Lys Gly His Asn Gly Thr Ile Glu Phe Thr Ser Leu Asp Ala			
210	215	220	
CAC AAG GGA GTA GCC TTG TCC AGA CGA AGT GAC GTT GAG ATC CTC GGC			841
His Lys Gly Val Ala Leu Ser Arg Arg Ser Asp Val Glu Ile Leu Gly			
225	230	235	
TAC TGC ATG CTG CGG TGG TTG TGT GGG AAA CTT CCC TGG GAA CAG AAC			889
Tyr Cys Met Leu Arg Trp Leu Cys Gly Lys Leu Pro Trp Glu Gln Asn			
240	245	250	
CTG AAG GAC CCT GTG GCT GTG CAG ACT GCT AAA ACA AAT CTG TTG GAC			937
Leu Lys Asp Pro Val Ala Val Gln Thr Ala Lys Thr Asn Leu Leu Asp			
255	260	265	
GAG CTC CCC CAG TCA GTG CTT AAA TGG GCT CCT TCT GGA AGC AGT TGC			985
Glu Leu Pro Gln Ser Val Leu Lys Trp Ala Pro Ser Gly Ser Ser Cys			
270	275	280	285
TGT GAA ATA GCC CAA TTT TTG GTA TGT GCT CAT AGT TTA GCA TAT GAT			1033
Cys Glu Ile Ala Gln Phe Leu Val Cys Ala His Ser Leu Ala Tyr Asp			
290	295	300	
GAA AAG CCA AAC TAT CAA GCC CTC AAG AAA ATT TTG AAC CCT CAT GGA			1081

Glu Lys Pro Asn Tyr Gln Ala Leu Lys Lys Ile Leu Asn Pro His Gly	
305 310 315	
ATA CCT TTA GGA CCA CTG GAC TTT TCC ACA AAA GGA CAG AGT ATA AAT	1129
Ile Pro Leu Gly Pro Leu Asp Phe Ser Thr Lys Gly Gln Ser Ile Asn	
320 325 330	
GTC CAT ACT CCA AAC AGT CAA AAA GTT GAT TCA CAA AAG GCT GCA ACA	1177
Val His Thr Pro Asn Ser Gln Lys Val Asp Ser Gln Lys Ala Ala Thr	
335 340 345	
AAG CAA GTC AAC AAG GCA CAC AAT AGG TTA ATC GAA AAA AAA GTC CAC	1225
Lys Gln Val Asn Lys Ala His Asn Arg Leu Ile Glu Lys Lys Val His	
350 355 360 365	
AGT GAG AGA AGC GCT GAG TCC TGT GCA ACA TGG AAA GTG CAG AAA GAG	1273
Ser Glu Arg Ser Ala Glu Ser Cys Ala Thr Trp Lys Val Gln Lys Glu	
370 375 380	
GAG AAA CTG ATT GGA TTG ATG AAC AAT GAA GCA GCT CAG GAA AGC ACA	1321
Glu Lys Leu Ile Gly Leu Met Asn Asn Glu Ala Ala Gln Glu Ser Thr	
385 390 395	
AGG AGA AGA CAG AAA TAT CAA GAG TCT CAA GAA CCT TTG AAT GAA GTA	1369
Arg Arg Arg Gln Lys Tyr Gln Glu Ser Gln Glu Pro Leu Asn Glu Val	
400 405 410	
AAC AGT TTC CCA CAA AAA ATC AGC TAT ACA CAA TTC CCA AAC TCA TTT	1417
Asn Ser Phe Pro Gln Lys Ile Ser Tyr Thr Gln Phe Pro Asn Ser Phe	
415 420 425	
TAT GAG CCT CAT CAA GAT TTT ACC AGT CCA GAT ATA TTC AAG AAG TCA	1465
Tyr Glu Pro His Gln Asp Phe Thr Ser Pro Asp Ile Phe Lys Lys Ser	
430 435 440 445	
AGA TCT CCA TCT TGG TAT AAA TAC ACT TCC ACA GTC AGC ACG GGG ATC	1513
Arg Ser Pro Ser Trp Tyr Lys Tyr Thr Ser Thr Val Ser Thr Gly Ile	
450 455 460	

ACA GAC TTA GAA AGT TCA ACT GGA CTT TGG CCT ACA ATT TCC CAG TTT 1561  
 Thr Asp Leu Glu Ser Ser Thr Gly Leu Trp Pro Thr Ile Ser Gln Phe  
 465 470 475  
 ACT CTT AGT GAA GAG ACA AAC GCA GAT GTT TAT TAT TAT CGC ATC ATC 1609  
 Thr Leu Ser Glu Glu Thr Asn Ala Asp Val Tyr Tyr Tyr Arg Ile Ile  
 480 485 490  
 ATA CCT GTC CTT TTG ATG TTA GTA TTT CTT GCT TTA TTT TTT CTC 1654  
 Ile Pro Val Leu Leu Met Leu Val Phe Leu Ala Leu Phe Phe Leu  
 495 500 505  
 TGAAGATGAT ACCAAAATTC CTTTGTGATAA TTTTSTAAGT TTCCAGCTCT TCACCGAAAT 1714  
 GTTGTATTCT TATTTTCAGTG TTTCCTTCCA GACATTTTSTA AGGTAATTGG CTTTAAAAAG 1774  
 AGAACATATT TTAACAAAAGT TTGTGGACAC TCTAAAAAAT AAAATTGCTT TGTACTAGT 1833

配列番号 : 4

配列の長さ : 508

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配 列

Met Pro Pro Lys Arg Asn Glu Lys Tyr Lys Leu Pro Ile  
 1 5 10  
 Pro Phe Pro Glu Gly Lys Val Leu Asp Asp Met Glu Gly Asn Gln Trp  
 15 20 25  
 Val Leu Gly Lys Lys Ile Gly Ser Gly Gly Phe Gly Leu Ile Tyr Leu  
 30 35 40 45  
 Ala Phe Pro Thr Asn Lys Pro Glu Lys Asp Ala Arg His Val Val Lys  
 50 55 60  
 Val Glu Tyr Gln Glu Asn Gly Pro Leu Phe Ser Glu Leu Lys Phe Tyr  
 65 70 75



Gln Arg Val Ala Lys Lys Asp Cys Ile Lys Lys Trp Ile Glu Arg Lys  
 80 85 90  
 Gln Leu Asp Tyr Leu Gly Ile Pro Leu Phe Tyr Gly Ser Gly Leu Thr  
 95 100 105  
 Glu Phe Lys Gly Arg Ser Tyr Arg Phe Met Val Met Glu Arg Leu Gly  
 110 115 120 125  
 Ile Asp Leu Gln Lys Ile Ser Gly Gln Asn Gly Thr Phe Lys Lys Ser  
 130 135 140  
 Thr Val Leu Gln Leu Gly Ile Arg Met Leu Asp Val Leu Glu Tyr Ile  
 145 150 155  
 His Glu Asn Glu Tyr Val His Gly Asp Val Lys Ala Ala Asn Leu Leu  
 160 165 170  
 Leu Gly Tyr Lys Asn Pro Asp Gln Val Tyr Leu Ala Asp Tyr Gly Leu  
 175 180 185  
 Ser Tyr Arg Tyr Cys Pro Asn Gly Asn His Lys Gln Tyr Gln Glu Asn  
 190 195 200 205  
 Pro Arg Lys Gly His Asn Gly Thr Ile Glu Phe Thr Ser Leu Asp Ala  
 210 215 220  
 His Lys Gly Val Ala Leu Ser Arg Arg Ser Asp Val Glu Ile Leu Gly  
 225 230 235  
 Tyr Cys Met Leu Arg Trp Leu Cys Gly Lys Leu Pro Trp Glu Gln Asn  
 240 245 250  
 Leu Lys Asp Pro Val Ala Val Gln Thr Ala Lys Thr Asn Leu Leu Asp  
 255 260 265  
 Glu Leu Pro Gln Ser Val Leu Lys Trp Ala Pro Ser Gly Ser Ser Cys  
 270 275 280 285  
 Cys Glu Ile Ala Gln Phe Leu Val Cys Ala His Ser Leu Ala Tyr Asp  
 290 295 300  
 Glu Lys Pro Asn Tyr Gln Ala Leu Lys Lys Ile Leu Asn Pro His Gly

305	310	315
Ile Pro Leu Gly Pro Leu Asp Phe Ser Thr Lys Gly Gln Ser Ile Asn		
320	325	330
Val His Thr Pro Asn Ser Gln Lys Val Asp Ser Gln Lys Ala Ala Thr		
335	340	345
Lys Gln Val Asn Lys Ala His Asn Arg Leu Ile Glu Lys Lys Val His		
350	355	360
Ser Glu Arg Ser Ala Glu Ser Cys Ala Thr Trp Lys Val Gln Lys Glu		
370	375	380
Glu Lys Leu Ile Gly Leu Met Asn Asn Glu Ala Ala Gln Glu Ser Thr		
385	390	395
Arg Arg Arg Gln Lys Tyr Gln Glu Ser Gln Glu Pro Leu Asn Glu Val		
400	405	410
Asn Ser Phe Pro Gln Lys Ile Ser Tyr Thr Gln Phe Pro Asn Ser Phe		
415	420	425
Tyr Glu Pro His Gln Asp Phe Thr Ser Pro Asp Ile Phe Lys Lys Ser		
430	435	440
Arg Ser Pro Ser Trp Tyr Lys Tyr Thr Ser Thr Val Ser Thr Gly Ile		
450	455	460
Thr Asp Leu Glu Ser Ser Thr Gly Leu Trp Pro Thr Ile Ser Gln Phe		
465	470	475
Thr Leu Ser Glu Glu Thr Asn Ala Asp Val Tyr Tyr Tyr Arg Ile Ile		
480	485	490
Ile Pro Val Leu Leu Met Leu Val Phe Leu Ala Leu Phe Phe Leu		
495	500	505

配列番号 : 5

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

CTAATACGAC TCACTATAGG GC

22

配列番号 : 6

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

TGTAGCGTGA AGACGACAGA A

21

配列番号 : 7

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

TCGAGCGGCC GCCCGGGCAGG T

21

配列番号 : 8

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

AGGGCGTGGT GCGGAGGGCGG T

21

配列番号 : 9

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

CCAGGGTTTT CCCAGTCACG AC

22

配列番号 : 10

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

TCACACAGGA AACAGCTATG AC

22

配列番号 : 11

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

TGTAGTTCAG AAGAAGATTT GAGG

24

配列番号 : 12

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

ATAATGGATC GCTTTGGGAG TGAC

24

配列番号 : 13

配列の長さ : 26

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

TGAAGGTCGG AGTCAACGGA TTTGGT

26

配列番号 : 14

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

CATGTGGGCC ATGAGGTCCA CCAC

24

配列番号 : 15

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

CCATCCTAAT ACGACTCACT ATAGGGC

27

配列番号 : 16

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

GGATTTTCCT GATACTGTTT GTGG

24

配列番号 : 17

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

ACCACAAACA GTATCAGGAA AATC

24

配列番号 : 18

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

ACCTTTAAAA AGTCAACTGT CCTG

24

配列番号 : 19

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

AAAAATTATC AAAAGGAATT TTGG

24

配列番号 : 20

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

TTACTCTTAG TGAAGAGACA AACGC

25

配列番号 : 21

配列の長さ : 36

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸 合成DNA

配 列

AGCTGCGGCC GCGGTCTGCG GCTTAGGTGA AAATGC

36

配列番号： 22

配列の長さ： 36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸 合成DNA

配 列

AGCTGCGGCC GCAAAACAAA GAAAAGGAAA TCTGGT

36

配列番号： 23

配列の長さ： 37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸 合成DNA

配 列

AGCTGCGGCC GCAAGTGATG CCACCAAAAA GAAATGA

37

配列番号： 24

配列の長さ： 36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他の核酸 合成DNA



## 配 列

AGCTGCGGCC GCTGGAAGGA AACACTGAAA TAAGAA

36

配列番号 : 25

配列の長さ : 10

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

## 配 列

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

配列番号 : 26

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

## 配 列

GATGGATCCG GTCTGCGGCT TAGGTGAAAA TGC

33

配列番号 : 27

配列の長さ : 60

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

## 配 列

GATGGATCCT TAGAGGTCTT CTTCTGAGAT GAGCTTCTGC TCCTTCTGGA CTCTCTTTCT

60

配列番号 : 28

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

GATGGATCCA GTGATGCCAC CAAAAAGAAA TGA

33

配列番号 : 29

配列の長さ : 60

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

GATGGATCCT TAGAGGTCTT CTTCTGAGAT GAGCTTCTGC TCGAGAAAAA ATAAAGCAAG

60

配列番号 : 30

配列の長さ : 31

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

GATGGATCCC CATGCCTCGT GTAAAAGCAG C

31

配列番号 : 31

配列の長さ : 31

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

GATGGATCCC CCAAAGAAAA GGAAATCTGG T 31

配列番号 : 32

配列の長さ : 31

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

GATGGATCCC CATGCCACCA AAAAGAAATG A 31

配列番号 : 33

配列の長さ : 31

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

GATGGATCCC CACAACATTT CGGTGAAGAG C 31

配列番号 : 34

配列の長さ : 29

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

CCTTGTGTTG TATGGGTGGA ACCCAGTGA

29

配列番号 : 35

配列の長さ : 31

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他の核酸 合成DNA

配 列

ACACCACGAT GCCTGGAGCA ATGGCAACAA C

31

配列番号 : 36

配列の長さ : 25

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配 列

Met Leu Pro Glu Ser Glu Asp Glu Glu Ser Tyr Asp Thr Glu Ser Glu Phe Thr

1

5

10

15

Glu Phe Thr Glu Asp Glu Leu

20

25

配列番号 : 37

配列の長さ : 19

配列の型 : アミノ酸

---

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配 列

Cys Gln Thr Glu Glu Ala Ile Gln Thr Arg Ser Arg Thr Arg Lys Arg Val Gln

1

5

10

15

Lys

## 請求の範囲

1. 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質またはその 1 もしくは数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換された配列を有しセリン／スレオニンキナーゼ活性を有するタンパク質。
2. 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質またはその 1 もしくは数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換された配列を有しセリン／スレオニンキナーゼ活性を有するタンパク質。
3. 配列番号 1 に記載の DNA 配列またはその相補配列にハイブリダイズする DNA 配列によりコードされ、セリン／スレオニンキナーゼ活性を有するタンパク質。
4. 配列番号 3 に記載の DNA 配列またはその相補配列にハイブリダイズする DNA 配列によりコードされ、セリン／スレオニンキナーゼ活性を有するタンパク質。
5. 請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のタンパク質をコードする DNA。
6. 請求項 5 に記載の DNA を含むベクター。
7. 請求項 6 に記載のベクターを保持する形質転換体。
8. 請求項 7 に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のタンパク質の製造方法。
9. 請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体。
10. 請求項 5 に記載の DNA もしくはその一部に対するアンチセンス DNA。
11. 請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のタンパク質のセリン／スレオニンキナーゼ活性を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、
  - (a) 被検化合物の存在下で、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のタンパク質とこれらタンパク質によりリン酸化を受ける基質とを接触させ、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のタンパク質のキナーゼ活性を検出する工程、
  - (b) 工程 (a) において検出されたキナーゼ活性を、被検化合物非存在下において検出したキナーゼ活性と比較し、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のタンパク質のキナーゼ活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

1 / 15

☒ 1

アダプター 1      5' CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT 3'  
3' GGCCCGTCCA 5'

アダプター 2      5' TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGT 3'  
3' GCCTCCCGCCA 5'

2 / 15

☒ 2

A.

セリン/スレオニンキナーゼの活性部位のコンセンサス配列

[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Tyr, Cys]-Xaa-[His, Tyr]-Xaa-Asp-[Leu, Ile, Val,  
Met, Phe, Tyr]-Lys-Xaa-Xaa-Asn-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Tyr, Cys]-[Leu,  
Ile, Val, Met, Phe, Tyr, Cys]-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Tyr, Cys]

B.

プロテインキナーゼATP結合部位のコンセンサス配列

[Leu, Ile, Val]-Gly-Xaa-Gly-Xaa-[Phe, Tyr, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Asn, His]  
-[Ser, Gly, Ala]-Xaa-[Leu, Ile, Val, Cys, Ala, Thr]-Xaa-Xaa-[Gly, Ser, Thr,  
Ala, Cys, Leu, Ile, Val, Met, Phe, Tyr]-Xaa(5 times or 18 times)-[Leu, Ile,  
Val, Met, Phe, Tyr, Trp, Cys, Ser, Thr, Ala, Arg]-[Ala, Ile, Val, Pro]-[Leu, Ile,  
Val, Met, Phe, Ala, Gly, Cys, Lys, Arg]-Lys



3/15

3

```

      9      18      27      36      45      54
5' ACC TGG GTG TTC CTA AGT ATA GGG GGT CTG GTC TAC ATG ACA AAA ATG GAA AAA
-----
    T  W  V  F  L  S  I  G  G  L  V  Y  M  T  K  M  E  K
    P  G  C  S  *  V  *  G  V  W  S  T  *  Q  K  W  K  K
    L  G  V  P  K  Y  R  G  S  G  L  H  D  K  N  G  K  S

      63      72      81      90      99      108
GTT ACA GGT TTA TGA TAA TGG ATC GCT TTG GGA GTG ACC TTC AGA AAA TAT ATG
-----
    V  T  G  L  *  *  W  I  A  L  G  V  T  F  R  K  Y  M
    L  Q  V  Y  D  N  G  S  L  W  E  *  P  S  E  N  I  *
    Y  R  F  M  I  M  D  R  F  G  S  D  L  Q  K  I  Y  E

      117      126      135      144      153      162
AAG CAA ATG CCA AAA GGT TTT CTC GGA AAA CTG TCT TGC AGC TAA GCT TAA GAA
-----
    K  Q  M  P  K  G  F  L  G  K  L  S  C  S  *  A  *  E
    S  K  C  Q  K  V  F  S  E  N  C  L  A  A  K  L  K  N
    A  N  A  K  R  F  S  R  K  T  V  L  Q  L  S  L  R  I

      171      180      189      198      207      216
TTC TGG ATA TTC TGG AAT ATA TTC ACG AGC ATG AGT ATG TGC ATG GAG ATA TCA
-----
    F  W  I  F  W  N  I  F  T  S  M  S  M  C  M  E  I  S
    S  G  Y  S  G  I  Y  S  R  A  *  V  C  A  W  R  Y  Q
    L  D  I  L  E  Y  I  H  E  H  E  Y  V  H  G  D  I  K

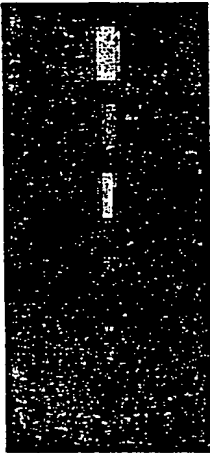
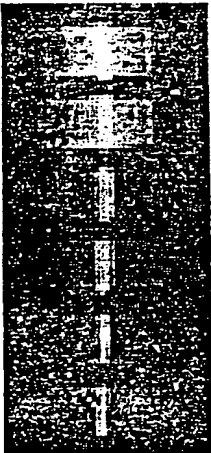
      225      234      243      252      261
AGG CCT CAA ATC TTC TTC TGA ACT ACA AGA ATC CTG ACC AGG TGT 3'
-----
    R  P  Q  I  F  F  *  T  T  R  I  L  T  R  C
    G  L  K  S  S  S  E  L  Q  E  S  *  P  G
    A  S  N  L  L  L  N  Y  K  N  P  D  Q  V

```

図 4

低 中 高 サイクル

A F A F A F



G3PDH

VRK1 (fls223)

VRK2

5 / 15

☒ 5

	10	20	30	40	50		
VRK1	1	MPRVKAAQAG	RQSSAKRHLA	EQFAVGEIIT	DMAKKEWKVG	LPIGQGGFGC	50
B1R	1	M-----	-----	-NFQ-GLVLT	DNCKNQWVVG	PLIGKGGFGS	50
	60	70	80	90	100		
VRK1	51	IYLADMNSSE	SVGSDAPCVV	KVEPSDNGPL	FTELKFYQRA	AKPEQIQKWI	100
B1R	51	IY-----	-TTNDNNYVV	KIEPKANGSL	FTEQAFYTRV	LKPSVIEEWK	100
	110	120	130	140	150		
VRK1	101	RTRKLKYLGV	PKYWGSGLHD	KNGKSYRFMI	MDRFGSDLQK	IYEANAKRFS	150
B1R	101	KSHNIKHVGL	ITCKAFGLYK	SINVEYRFLV	INRLGADLDA	VIRANNRRLP	150
	160	170	180	190	200		
VRK1	151	RKTVLQLSLR	ILDILEYIHE	HEYVHGDIKA	SNLLLNYKNP	DQVYLVLDYGL	200
B1R	151	KRSVMLIGIE	ILNTIQFMHE	QGYSHGDIKA	SNIVLDQIDK	NKLYLVLDYGL	200
	210	220	230	240	250		
VRK1	201	AYRYCPEGVH	KEYKEDPKRC	HDGTIEFTSI	DAHNGVAPSR	RGDLEILGYC	250
B1R	201	VSKFMSNGEH	VPFIRNPKNM	DNGTLEFTPI	DSHKGYVVS	RGDLETGVC	250
	260	270	280	290	300		
VRK1	251	MIQWLTGHL	WED--NLKDP	KYVRDSKIRY	RENIASLMDK	CFPEKNKPGE	300
B1R	251	MIRWLGGILP	WTKISETKNC	ALVSATKQKY	VNNTATLLMT	SL--QYAPRE	300
	310	320	330	340	350		
VRK1	301	IAKYMETVKL	LDYTEKPLYE	NLRDILLQGL	KAIGSKDDGK	LDLSVVENG	350
B1R	301	LLQYITMVNS	LTYFEENPYD	EFRHILMQG-	-----	-----	350
	360	370	380	390	400		
VRK1	351	LKAKTITKKR	KKEIEESKEP	GVEDTEWSNT	QTEEAQTRS	RTRKRVQK..	400
B1R	351	-----	-----	-----	-----	----VYY..	400

6 / 1 5

☒ 6

	10	20	30	40	50		
VRK1	1	MPRVKAAQAG	RQSSAKRHLA	EQFAVGGEIIT	DMAKKEWKVG	LPIGQGGFGC	50
VRK2	1	MPP-----	-KRNEKYKLP	IPFPEGKVLD	DMEGNQWVLG	KKIGSGGFG	50
	60	70	80	90	100		
VRK1	51	IYLADMNSSE	SVGSDAPCVV	KVEPSDNGPL	FTELKFYQRA	AKPEQIQKWI	100
VRK2	51	IYLA--FPTN	KPEKDARHVV	KVEYQENGPL	FSELKFYQRV	AKKDCIKKWI	100
	110	120	130	140	150		
VRK1	101	RTRKLKYLGV	PKYWGSGLHD	KNGKSYRFMI	MDRFGSDLQK	IYEANAKRFS	150
VRK2	101	ERKQLDYLGI	PLFYGSGLTE	FKGRSYRFMV	MERLGIDLQK	ISGQNGT-FK	150
	160	170	180	190	200		
VRK1	151	RKTVLQLSLR	ILDILEYIHE	HEYVHGDICA	SNLLLNYPKN	DQVYLVYDGL	200
VRK2	151	KSTVLQLGIR	MLDVLEYIHE	NEYVHGDVKA	ANLLLGYPKN	DQVYLADYGL	200
	210	220	230	240	250		
VRK1	201	AYRYCPEGVH	KEYKEDPKRC	HDGTIEFTSI	DAHNGVAPSR	RGDLEILGYC	250
VRK2	201	SYRYCPNGNH	KQYQENPRKG	HNGTIEFTSL	DAHKGVALSR	RSDVEILGYC	250
	260	270	280	290	300		
VRK1	251	MIQWLTGHLP	WEDNLKDPKY	VRDSKIRYRE	NIASLMDKCF	PEKNKPGEIA	300
VRK2	251	MLRWLCGKLP	WEQNLKDPVA	VQAKTNLLD	ELPQSVLKWA	PSGSSCCEIA	300
	310	320	330	340	350		
VRK1	301	KYMETVKLLD	YTEKPLYENL	RDILLQGLKA	IGSKDDGKLD	LSV-----	350
VRK2	301	QLVLCAHSLA	YDEKPNYQAL	KKILNPHGIP	LGPLDFSTKG	QSINVHTPNS	350
	360	370	380	390	400		
VRK1	351	--VENGGKKA	KTITKKRKKE	IEES--KEPG	VED-TEWSNT	QTE-----	400
VRK2	351	QKVDSQKAAT	KQVNKAHNRL	IEKKVHSERS	AESCATWKVQ	KEEKLIGLMN	400
	410	420	430	440	450		
VRK1	401	-EAIQTRSRT	RKRQVK----	-----	-----	-----	450
VRK2	401	NEAAQESTRR	RQKYQESQEP	LNEVNSFPQK	ISYTQFPNSF	YEPHQDFTSP	450
	460	470	480	490	500		
VRK1	451	-----	-----	-----	-----	-----	500
VRK2	451	DIFKKSRSPS	WYKYTSTVST	GITDLESSTG	LWPTISQFTL	SEETNADVYY	500
	510	520	530	540	550		
VRK1	501	-----	-----	-----	-----	-----	550
VRK2	501	YRIIIPVLLM	LVFLALFFL	-----	-----	-----	550

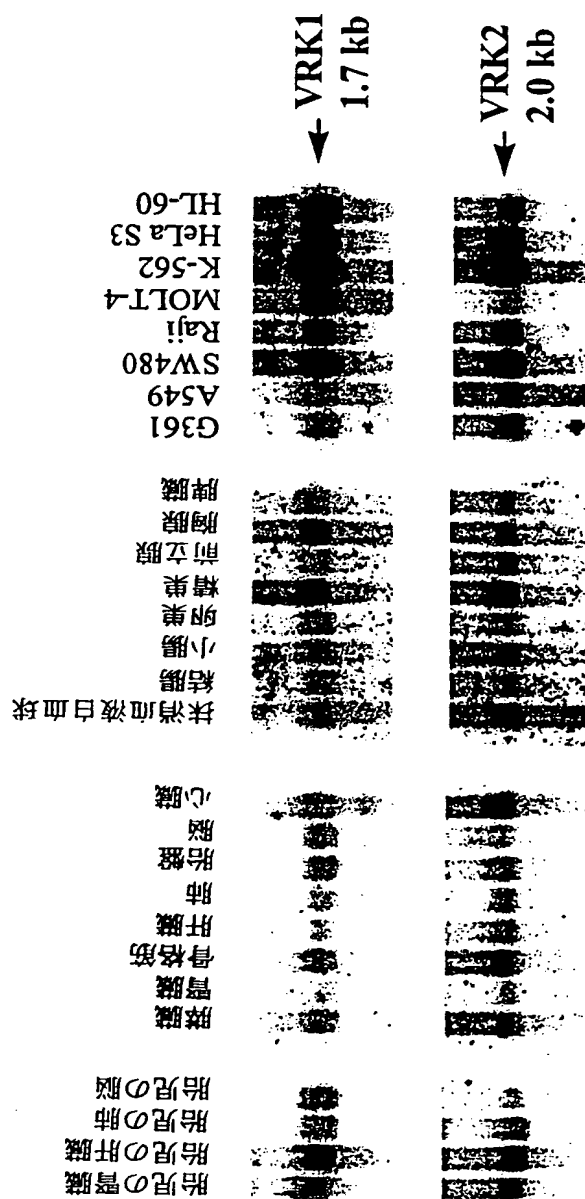
7 / 15

☒ 7

	10	20	30	40	50	
VRK2	1	MPPKRNEKYK LPIPFPEGKV	LDDMEGNQWV	LGKKIGSGGF	GLIYLAFPTN	50
B1R	1	MN-----	----F-QGLV	LTDNCKNQWV	VGPLIGKGGF	GSIIY-----
	60	70	80	90	100	
VRK2	51	KPEKDARHVV	KVEYQENGPL	FSELKFYQRV	AKKDCIKKW1	ERKQLDYLGI
B1R	51	-TTNDNNYVV	KIEPKANGSL	FTEQAFYTRV	LKPSVIEEWK	KSHNIKHVGL
	110	120	130	140	150	
VRK2	101	PLFYGSGLTE	FKGRSYRFMV	MERLGIDLQK	-ISGQNGTFK	KSTVLQLGIR
B1R	101	ITCKAFGLYK	SINVEYRFLV	INRLGADLDA	VIRANNNRLP	KRSVMLIGIE
	160	170	180	190	200	
VRK2	151	MLDVLEYIHE	NEYVHGDVKA	ANLLLGYNP	DQVYLADYGL	SYRYCPNGNH
B1R	151	ILNTIQFMHE	QGYSHGDIKA	SNIVLDQIDK	NKLYLVQDYL	VSKFMSNGEH
	210	220	230	240	250	
VRK2	201	KQYQENPRKG	HNGTIEFTSL	DAHKGVALSR	RSDVEILGYC	MLRWLCGKLP
B1R	201	VPFIRNPNKM	DNGTLEFTPI	DSHKGYYVSR	RGDLETGYC	MIRWLGILP
	260	270	280	290	300	
VRK2	251	WEQ--NLKDP	VAVQTAKTNL	LDE---LPQS	VLKWAPSGSS	CCEIAQFLVC
B1R	251	WTKISETKNC	ALVSATKQKY	VNNTATLLMT	SLQYAPR---	--ELLQYITM
	310	320	330	340	350	
VRK2	301	AHSLAYDEKP	NYQALKKILN	PHGIPLGPLD	FSTKGQSINV	HTPNSQKVDS
B1R	301	VNSLTYFEFP	NYDEFRHILM	Q-----	-----	-----
	360	370	380	390	400	
VRK2	351	QKAATKQVNK	AHNRLIEKKV	HSERSAESCA	TWKVQKEEKL	IGLMNNEAAQ
B1R	351	-----	-----	-----	-----	-----
	410	420	430	440	450	
VRK2	401	ESTRRRQKYQ	ESQEPLNEVN	SFPQKISYTQ	FPNSFYEPHQ	DFTSPDIFKK
B1R	401	-----	-----	-----	-----	-----
	460	470	480	490	500	
VRK2	451	SRSPSWYKYT	STVSTGITDL	ESSTGLWPTI	SQFTLSEETN	ADVYYYR111
B1R	451	-----	-----	-----	-----	-GVYY-----
	510	520	530	540	550	
VRK2	501	PVLLMLVFLA	LFFL.....	.....	.....	.....
B1R	501	-----	-----	-----	-----	-----

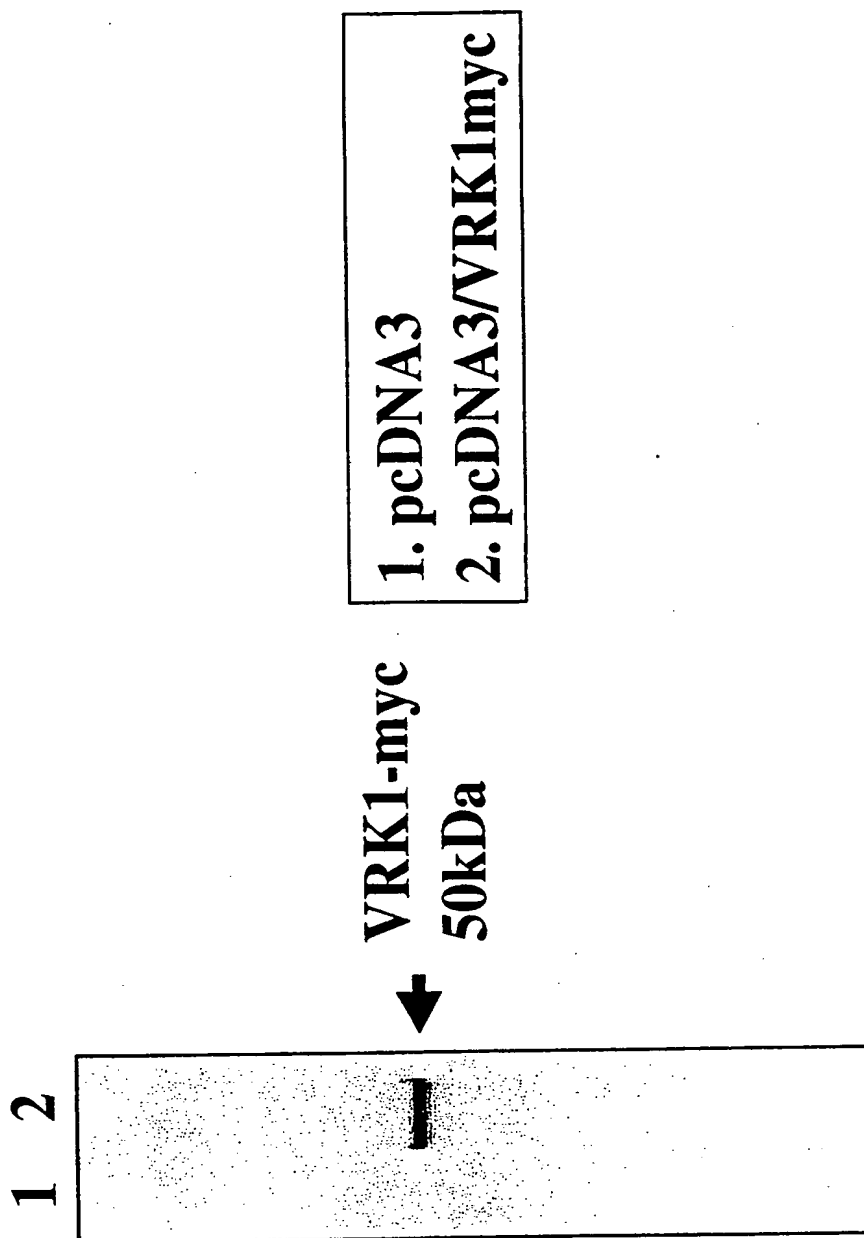
8 / 15

図 8



9 / 15

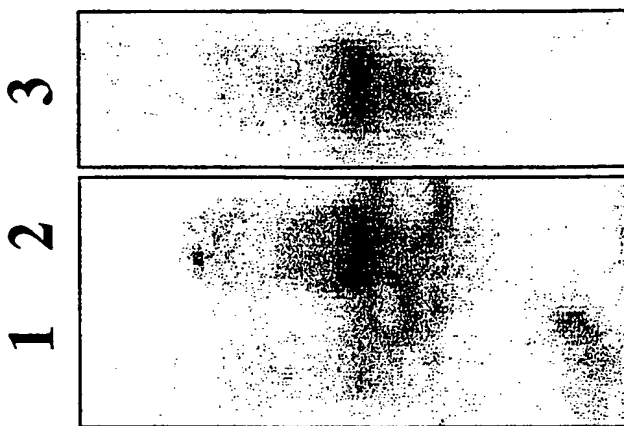
☒ 9



10 / 15

☒ 10

1. pCOS
2. pCOS/VRK1w
3. HepG2



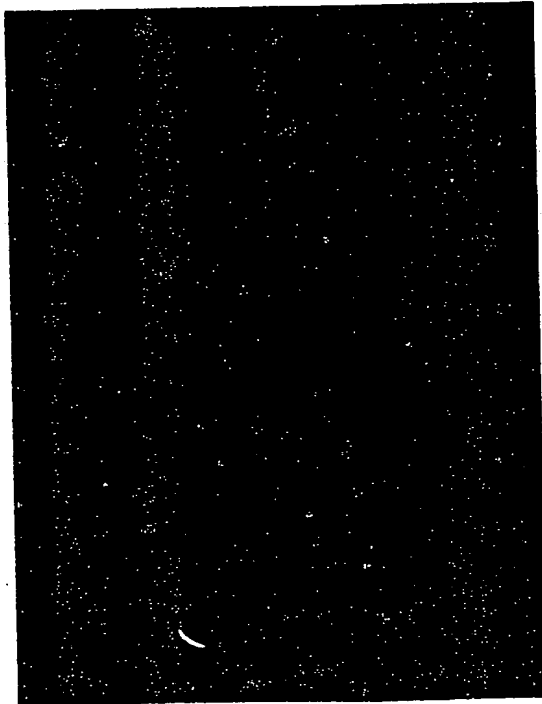


☒ 11

pCOS/VRK1w



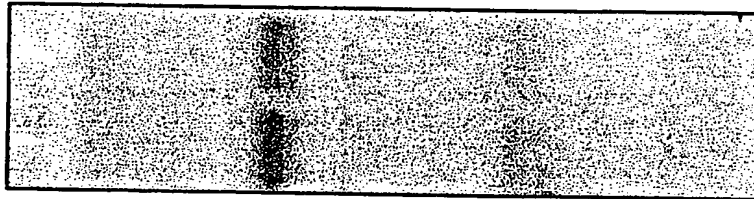
pCOS



1 2 / 1 5

☒ 1 2

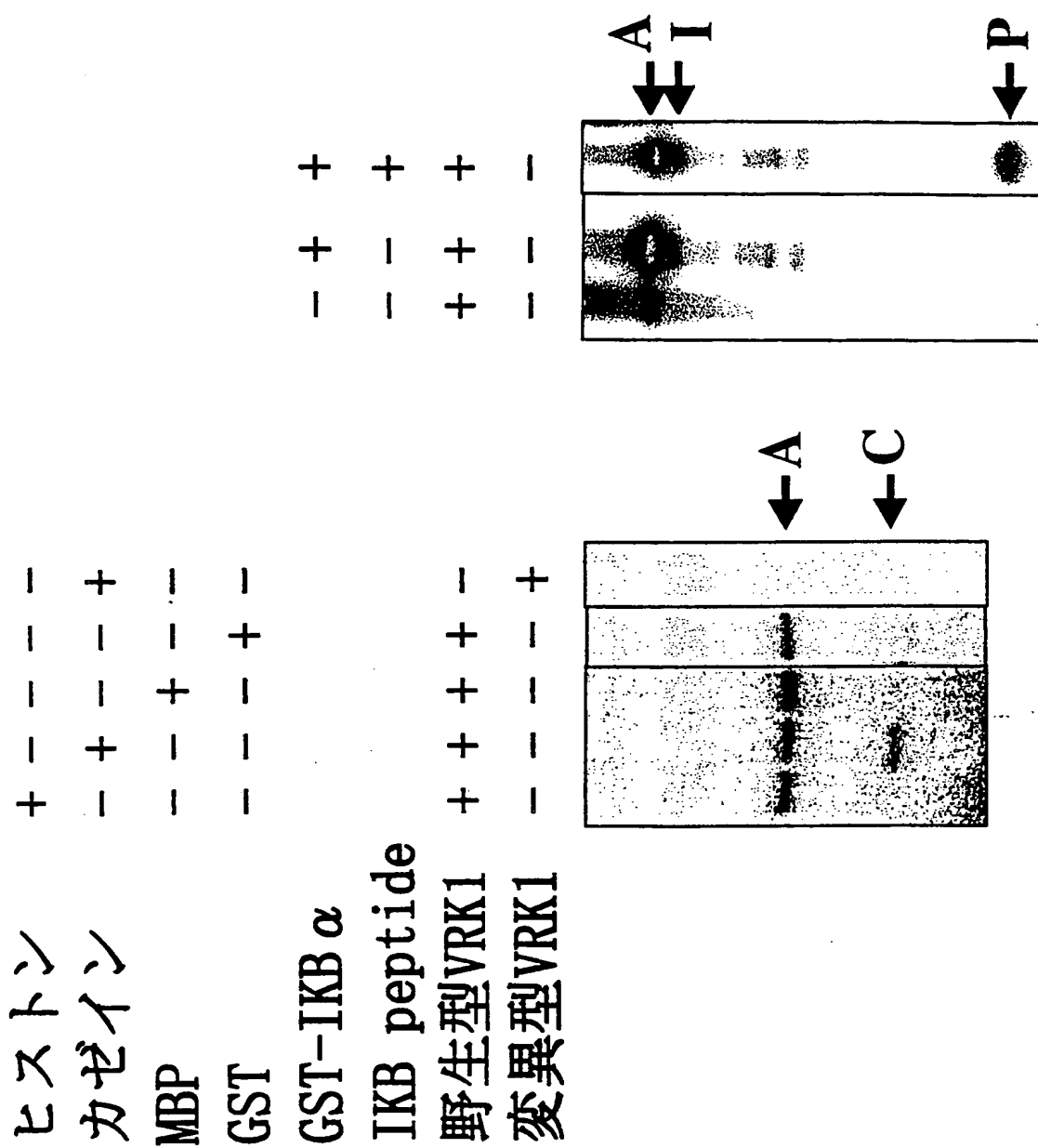
1 2



1. pGEX/VRK1w  
2. pGEX/VRK1K71W

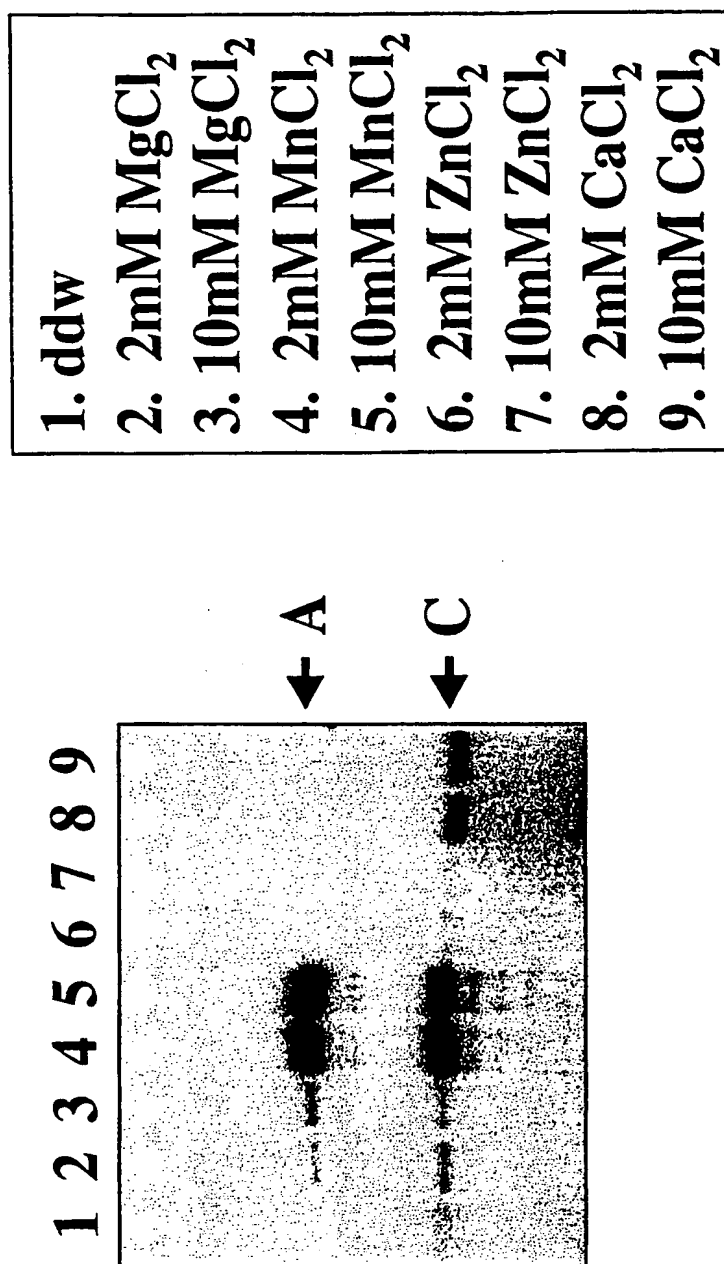
13 / 15

図 13



14 / 15

図 14



15 / 15

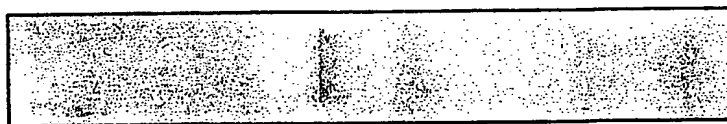
☒ 15

K. K 5 6 2 細胞抽出液

VRK1  
50kDa



K



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/04855

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/54, C12N5/00, C12P21/02, C12Q1/48, C12N9/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/54, C12N5/00, C12P21/02, C12Q1/48, C12N9/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Genbank/EMBL/DDBJ (GNEETYX), BIOSYS (DIALOG), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Genomics, Vol. 45(2) (1997-Oct) Nezu J-I et al. "Identification of two novel human putative serine-threonine kinases, VRK1 and VRK2, with structural similarity to vaccinia virus B1R kinase" p. 327-331	1 - 11
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 92(18) (1995) Lee N.H. et al. "Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene expression profiles in PC-12 cells before and after nerve growth factor treatment" p. 8303-8307	1 - 11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

February 2, 1998 (02. 02. 98)

Date of mailing of the international search report

February 10, 1998 (10. 02. 98)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C12N15/54, C12N5/00, C12P21/02, C12Q1/48, C12N9/12

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C12N15/54, C12N5/00, C12P21/02, C12Q1/48, C12N9/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ (GENETYX), BIOSYS (DIALOG),  
MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Genomics, Vol. 45[2] (1997-Oct) Nezu J-I <i>et al.</i> 「Identification of two novel human putative serine-threonine kinases, VRK1 and VRK2, with structural similarity to vaccinia virus B1R kinase」 p. 327-331	1-11
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 92[18] (1995) Lee N.H. <i>et al.</i> 「Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene expression profiles in PC-12 cells before and after nerve growth factor treatment」 p. 8303-8307	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.02.98

国際調査報告の発送日

10.02.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 倫子



4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**